






THE ISOLATION AND PRODUCTION OF CATALYTIC ANTIBODIES USING PHAGE TECHNOLOGY**Publication number:** JP10507341 (T)**Publication date:** 1998-07-21**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:**

- international: *G01N33/531; A61K39/395; A61K45/00; A61K48/00; A61P43/00; C07K16/00; C07K16/44; C12N9/00; C12N15/09; C12N15/10; C40B40/02; A61K38/00; C12R1/19; G01N33/531; A61K39/395; A61K45/00; A61K48/00; A61P43/00; C07K16/00; C07K16/44; C12N9/00; C12N15/09; C12N15/10; C40B40/02; A61K38/00; (IPC1-7): C12N15/09; A61K39/395; A61K45/00; A61K48/00; C07K16/00; C12N9/00; G01N33/531; C12N9/00; C12R1/19*

- European: *C40B40/02; C07K16/00; C07K16/44; C12N9/00B; C12N15/10C1; C12N15/10C100*

Application number: JP19940525622T 19940330**Priority number(s):** WO1994US03420 19940330**Also published as:**

 WO9527045 (A1)
 EP0759976 (A1)
 EP0759976 (A4)
 AU7014194 (A)
 AU695406 (B2)

Abstract not available for JP 10507341 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9527045 (A1)**

Disclosed and claimed are methods for producing catalytic antibodies, including human catalytic antibodies, from bacteriophage. The methods require the cloning, selection, screening, and isolation of catalytic antibodies. Also disclosed and claimed are the products themselves, the catalytic antibodies, made from the phage technology. In addition, catalytic antibodies produced from the phage technology and useful in prodrug activation are disclosed and claimed. And finally, the invention also understands the production of catalytic antibodies to phosphonates.

~~~~~  
Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-507341

(43) 公表日 平成10年(1998) 7月21日

|                                    |       |                |         |
|------------------------------------|-------|----------------|---------|
| (51) Int.Cl. <sup>6</sup>          | 識別記号  | F I            |         |
| C 1 2 N 15/09                      | Z N A | C 1 2 N 15/00  | Z N A A |
| A 6 1 K 39/395                     |       | A 6 1 K 39/395 | Q       |
| 45/00                              |       | 45/00          |         |
| 48/00                              | A E D | 48/00          | A E D   |
| C 0 7 K 16/00                      |       | C 0 7 K 16/00  |         |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 129 頁) 最終頁に続く |       |                |         |

|               |                             |          |                                                                                |
|---------------|-----------------------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願平7-525622                 | (71) 出願人 | アイジェン, インコーポレイテッド<br>アメリカ合衆国 メリーランド 20877,<br>ガイザースバーグ, インダストリアル<br>ドライブ 16020 |
| (86) (22) 出願日 | 平成6年(1994) 3月30日            | (72) 発明者 | スミス, ロジャー ジー,<br>アメリカ合衆国 メリーランド 21755,<br>ジェファーソン, ミルフォード コート<br>4660          |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成8年(1996) 9月30日            | (72) 発明者 | マッカフェーティ, ジョン<br>イギリス国 シービー2 ケンブリッジシ<br>ョアー, ソーストン, ウェイクリン ア<br>ベニュー 32        |
| (86) 国際出願番号   | P C T / U S 9 4 / 0 3 4 2 0 | (74) 代理人 | 弁理士 山本 秀策                                                                      |
| (87) 国際公開番号   | W O 9 5 / 2 7 0 4 5         |          | 最終頁に続く                                                                         |
| (87) 国際公開日    | 平成7年(1995) 10月12日           |          |                                                                                |

(54) 【発明の名称】 ファージ技術を用いる触媒性抗体の単離および産生

(57) 【要約】

バクテリオファージから、ヒト触媒性抗体を含む触媒性抗体を産生する方法が開示されそして請求されている。この方法は、触媒性抗体のクローニング、選択、スクリーニング、および単離を必要とする。ファージ技術から作成される産物自体、すなわち触媒性抗体も、開示されそして請求されている。さらに、ファージ技術から産生されそしてプロドラッグの活性化に有用な触媒性抗体が開示されそして請求されている。そして最後に、本発明はまた、ホスホネートに対する触媒性抗体の産生も理解する。

## 【特許請求の範囲】

1. フェージ上に提示される触媒性抗体を産生する方法であって、以下の工程：

(a)抗体由来ドメインの遺伝子ライブラリーを生成する工程；

(b)フェージ発現ベクター中に該ドメインをコードするものを挿入する工程；

および

(c)該触媒性抗体を単離する工程、

を包含する、方法。

2. 前記触媒性抗体が単鎖抗体である、請求項1に記載の方法。

3. 工程(c)で単離される抗体がE. coli細胞を培養することにより大量に産生される、請求項1に記載の方法。

4. 請求項1に記載の方法により調製される触媒性抗体。

5. 請求項1に記載の方法であって、前記抗体由来ドメインの遺伝子ライブラリーが以下の群：

(a)免疫された動物由来のリンパ球から得られる遺伝子フラグメント；

(b)免疫されていない動物由来のリンパ球から得られる遺伝子フラグメント；

(c)VHおよびVL鎖のシャッフリングにより得られる遺伝子フラグメント；

(d)CDR領域のシャッフリングにより得られる遺伝子フラグメント；

(e)CDR領域の変異誘発により得られる遺伝子フラグメント；

(f)インプリンティング；または

(g)合成抗体遺伝子、

の1つまたはそれより多いものから生成される、方法。

6. フェージ上に提示される触媒性抗体を単離する方法であって、以下の工程：

(a)抗原を調製する工程；

(b)該抗原で免疫する工程；

(c)該免疫した動物からVHおよびVLドメインのライブラリーを生成する工程；

(d)フェージディスプレイ抗体を生成するためにフェージ発現ベクター中に該VHおよびVLドメインをクローニングする工程；

(e)該抗原に特異的に結合するフェージディスプレイ抗体を選択する工程；

(f)基質に対する触媒活性について該選択したファージディスプレイ抗体をスクリーニングする工程；および

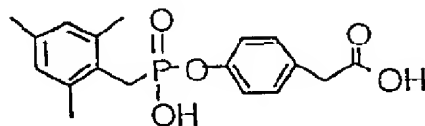
(g)該触媒性抗体を単離する工程、  
を包含する、方法。

7. 前記触媒性抗体が単鎖抗体である、請求項6に記載の方法。

8. 前記抗原が遷移状態アナログである、請求項6に記載の方法。

9. 前記抗原がホスホネートである、請求項6に記載の方法。

10. 前記抗原が



である、

請求項6に記載の方法。

11. 請求項6に記載の方法により調製される触媒性抗体。

12. ファージ上に提示される触媒性ヒト抗体を単離する方法であって、以下の工程：

(a)抗原を調製する工程；

(b)VHおよびVLドメインのライブラリーを生成する工程；

(c)ファージディスプレイ抗体を生成するためにファージ発現ベクター中に該VHおよびVLドメインをクローニングする工程；

(d)該抗原に特異的に結合するファージディスプレイ抗体を選択する工程；

(e)基質に対する触媒活性について該選択されたファージディスプレイ抗体をスクリーニングする工程；および

(f)該触媒性抗体を単離する工程、  
を包含する、方法。

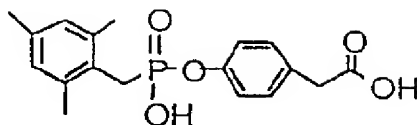
13. 前記ライブラリーがマウス由来である、請求項12に記載の方法。

14. 前記抗原が遷移状態アナログである、請求項12に記載の方法。

15. 前記抗原がホスホネートである、請求項12に記載の方法。



16. 前記抗原が



である、

請求項12に記載の方法。

17. 請求項12に記載の方法により調製される触媒性抗体。

18. 鎖シャッフリングを介してファージ上に提示される触媒性抗体を産生する方法であって、以下の工程：

- (a)鎖シャッフリングされたライブラリーを形成するためにVL遺伝子のライブラリーをVH遺伝子と組み合わせる工程；
  - (b)シャッフリングされた鎖をクローニングする工程；
  - (c)ファージ上で該鎖シャッフリングされた抗体を発現させる工程；
  - (d)抗原に対して選択する工程；および
  - (e)触媒活性についてスクリーニングする工程、
- を包含する、方法。

19. CDRシャッフリングを介してファージ上に提示される触媒性抗体を産生する方法であって、以下の工程：

- (a)VLおよびVH遺伝子を単離する工程；
  - (b)CDR領域のライブラリーを単離する工程；
  - (c)CDRシャッフリングされたライブラリーを生成するために該VLおよびVH遺伝子を該CDR領域のライブラリーと再度組み合わせる工程；および
  - (d)該CDRシャッフリングされたライブラリーをクローニングする工程；
  - (e)ファージ上で該CDRシャッフリングされたライブラリーを発現させる工程；
  - (f)抗原に対して選択する工程；および
  - (g)触媒活性についてスクリーニングする工程、
- を包含する、方法。

20. インプリンティングを介してファージ上に提示される触媒性抗体を産生する方法であって、以下の工程：

- (a)抗体のセットを選択する工程；
  - (b)該抗体からVH遺伝子のセットおよびVL遺伝子のセットを単離する工程；
  - (c)2つの組み合わせライブラリーを形成するために、該VHのセットをVLのライブラリーと組み合わせ、そして該VLのセットをVHのライブラリーと組み合わせる工程；
  - (d)該組み合わせライブラリーをクローニングする工程；
  - (e)該ライブラリーをファージ上で発現させる工程；
  - (f)抗原に対して選択する工程；
  - (g)VHおよびVL遺伝子の選択されたライブラリーを単離する工程；
  - (h)該VHおよびVL遺伝子のライブラリーを組み合わせる工程；
  - (i)該組み合わせられたライブラリーをクローニングする工程；
  - (j)該組み合わせられたライブラリーをファージ上で発現させる工程；
  - (k)抗原に対して再選択する工程；および
  - (l)触媒活性についてスクリーニングする工程、
- を包含する、方法。

21. 抗体、6 His残基、myc遺伝子の一部、およびファージ遺伝子IIIを含む、組換えクローニングベクター。

22. 前記ベクターが、以下のエレメント：結合活性を保持する抗体、金属イオン結合活性を保持するHis-6配列、および抗原性を保持するmyc配列からなる融合タンパク質の産生を可能にする、請求項21に記載の組換えクローニングベクター。

23. 前記ベクターが、以下のエレメント：結合活性を保持する抗体、His-6配列、myc配列、および生物学的活性を保持する遺伝子IIIタンパク質からなる融合タンパク質の産生を可能にする、請求項21に記載の組換えクローニングベクター。

24. インビボで分子内の特定の結合の切断または形成速度を上昇させる方法であって、ファージ由来の触媒性抗体の有効量を動物に導入する工程を包含する、方法。

25. プロドラッグのインビボでの活性化の方法であって、以下の工程：

(a) プロドラッグを患者に導入する工程であって、該プロドラッグが、切断されて、該薬物の活性形態を放出する化学結合を有する、工程；および

(b) 該プロドラッグ中の該結合を切断し得るファージ由来の触媒性抗体の有効量を該患者に導入する工程、  
を包含する、方法。

26. インビボで分子内の特定の結合の切断または形成速度を上昇させることにより、動物で生物学的機能を活性化または不活性化する方法であって、触媒性抗体の有効量を動物に導入する工程を包含し、該抗体が請求項1に記載の方法により産生される、方法。

27. インビボで分子内の特定の結合の切断または形成速度を上昇させることにより、動物で生物学的機能を活性化または不活性化する方法であって、触媒性抗体の有効量を動物に導入する工程を包含し、該抗体が請求項18に記載の方法により産生される、方法。

28. インビボで分子内の特定の結合の切断または形成速度を上昇させることにより、動物で生物学的機能を活性化または不活性化する方法であって、触媒性抗体の有効量を動物に導入する工程を包含し、該抗体が請求項19に記載の方法により産生される、方法。

29. インビボで分子内の特定の結合の切断または形成速度を上昇させることにより、動物で生物学的機能を活性化または不活性化する方法であって、触媒性抗体の有効量を動物に導入する工程を包含し、該抗体が請求項20に記載の方法により産生される、方法。

## 【発明の詳細な説明】

ファージ技術を用いる触媒性抗体の単離および産生

## 関連出願についての参考

本出願は、1991年7月10日の国際出願日、1992年1月23日の公開日を有する国際出願 WO 92/01047 (PCT/GB91/01134) の一部継続出願であり、そして米国が指定国であり、この国際出願 WO 92/01047 (PCT/GB91/01134) は本明細書中に参考として援用されている。

## 発明の分野

本発明は、バクテリオファージ上に提示される触媒性抗体の単離および産生に関し、そしてより特定には、ヒト触媒性抗体の単離および産生に関する。本発明はまた、プロドラッグの活性化に使用するための触媒性抗体の単離および産生に関する。本発明はさらに、遷移状態のアナログに結合する触媒性抗体の産生に関する。

## 発明の背景

モノクローナル抗体は、慣例的に、特定の特異性を有する生物学的機能性抗体分子の1つの形態を分泌する単一の免疫グロブリン産生細胞由来の不死化哺乳動物細胞株を樹立することにより作成される。この抗体分泌哺乳動物細胞株が不死化されているので、抗体の特徴付けはバッチからバッチへ再生可能である。モノクローナル抗体の重要な特性は、特定の抗原に対する特異性、および製造され得る再生可能性である。

構造的には、最も単純な抗体 (IgG) は、4つのポリペプチド鎖、すなわちジスルフィド結合により連結された2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む。軽鎖には、K (カッパ) およびλ (ラムダ) と呼ばれる2つの異なる形態がある。各鎖は定常領域(C)および可変領域(V)を有する。各鎖は一連のドメインに組み立てられる。軽鎖は2つのドメインを有し、1つはC領域に対応しそして他はV

領域に対応する。重鎖は4つのドメインを有し、1つはV領域に対応しそして3つのドメイン (1、2、および3) はC領域にある。抗体は2つのアーム (各ア

ームはFab領域である)を有し、それらのそれぞれは互いに関連するVLおよびVH領域を有する。このV領域の対(VLおよびVH)は、1つの抗体と別の抗体とは異なり(アミノ酸配列の改変のため)、そしてともに抗原を認識して抗原結合部位(ABS)を提供する原因である。さらにより詳細には、各V領域は4つのフレームワーク領域(FR)により分断された3つの相補性決定領域(CDR)から形成される。CDRは、可変領域のうちの最も可変の部分であり、そして重要な抗原結合機能を行う。CDR領域は、組換え、変異、および選択を包含する複合プロセスを介して多くの潜在的な生殖系列配列に由来する。

結合抗原の機能が抗体全体のフラグメントにより行われ得ることが示されている。結合フラグメントの例は、(i)VL、VH、CL、およびCH1ドメインからなるFabフラグメント；(ii)VHおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iii)抗体の一本のアームのVLおよびVHドメインからなるFvフラグメント；(iv)VHドメインからなるdAbフラグメント(Wardら、Nature 341(1989):544-546)；(v)単離したCDR領域；および(vi)ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結した2つのFabフラグメントを含む二価フラグメントである、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントである。

Fvフラグメントの2つのドメインが別の遺伝子によりコードされているが、組換え法により、それらを単一のタンパク質鎖(単鎖Fv(scFv)として公知；Birdら、Science 242(1988):423-426；Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85(1988):5879-5883)として作成させ得る合成リンカーを作成できることが証明されている。これらのscFvフラグメントは、既に単離されているモノクローナルからの遺伝子から組み立てられた。発明者らの先の出願(WO 92/01047)において、既に単離された抗体の一部ではないVHおよびVLドメインからのscFvフラグメントを組み立てるためのプロセスを記載している。

モノクローナル抗体、そのフラグメント、および誘導体は非常に有益であるが、それにもかかわらずそれらに関連する多くの制限がある。第1に、ヒト不死化細胞株により産生されたモノクローナル抗体の治療的適用は、広範な病気の処置に大きな見込みがある(Lennox、Clinical Applications of Monoclonal Antibodies、Academic Press、1975)。

ies、British Medical Bulletin 1984)。不運にも、不死化抗体産生ヒト細胞株は樹立するのが非常に難しく、そしてそれらは抗体の収率が低い(約 $1\mu\text{g/ml}$ )。対照的に、同量の齧歯類細胞株は、高量の抗体を得る(約 $100\mu\text{g/ml}$ )。しかし、これらの外来の齧歯類タンパク質のヒトへの繰り返しの投与は有害な過敏反応を生じ得る。結果として、これらの齧歯類由来のモノクローナル抗体は治療的使用が制限されている。

第2に、モノクローナル抗体の単離における重要な局面は、所望の特異性特徴を有する抗体を産生する細胞を単離するために、種々の特異性を有する抗体産生細胞のどれだけの異なるクローンが、サンプリングされるに理論的にどれだけ必要とされるかと比較して、実際に樹立されてサンプリングされ得るかということである(Milstein、Royal Soc. Croonian Lecture、Proc. R. Soc. London B. 239(1990):1-16)。例えば、マウスの免疫系のリンパ球により任意の1つの時点において発現される異なる特異性の数は約 $10^7$ であると考えられ、そしてこれは可能な特異性のレパートリーのほんの少ない割合でしかない。しかし、所望の特異性を有する代表的な抗体産生細胞の単離の間、研究者は $10^3\sim 10^4$ の個別の特異性をサンプリングし得るのみである。この問題は、ヒトにおいていっそう悪く、この場合約 $10^{12}$ リンパ球特異性を有するが、 $10^3$ または $10^4$ のサンプリングでの制限が残る。

この問題は、免疫療法の使用により実験動物においてある程度まで軽減されている。したがって、特定のエピトープに対する特異性を有するモノクローナル抗体を産生しようとする場合、動物をそのエピトープを発現する免疫原で免疫する。次いで、この動物は、免疫原に対する免疫応答を高め、そしてこのエピトープに対する特異性を有するリンパ球が増殖する。所望の特異性を有するリンパ球のこの増殖のため、サンプリング手順においてそれらを検出することがより容易になる。しかし、このアプローチは、適切な免疫原が入手可能であり得ないので、すべての場合で成功するわけではない。さらに、ヒトモノクローナル抗体を(例えば、治療投与のために)産生しようとする場合、このようなアプローチは実際にまたは倫理的に実行できそうにない。

発明者らの先の出願(WO 92/01047)において、発明者らは、大きな生物学的

機能性の結合分子（例えば、抗体フラグメント、酵素、およびレセプター）を表面に発現および提示し、そしてインタクトかつ感染性のままであるバクテリオファージを構築する方法を記載している。発明者らは、ウイルス粒子およびこのウイルス表面で提示される結合分子を含む構造物を、「パッケージ」と称した。結合分子が抗体、抗体の誘導体もしくはフラグメント、または免疫グロブリンドメインと相同であるドメインである場合、発明者らはこのパッケージを「ファージ抗体」（pAb）と称した。しかし、文脈が他を記載する以外は、ファージ抗体という用語が一般的に用いられる場合、それはまた、ウイルス粒子およびこのウイルス表面で提示される生物学的機能性の結合分子を含むあらゆるパッケージをいうと解釈された。WO 92/01047の最初の出願以来、機能的抗体およびバクテリオファージの表面で発現される他のタンパク質ドメインの多くの例が、文献および別の特許出願の両方に報告されている。

不死化された細胞の細菌細胞での「ファクトリー」としてのこの簡単な置換は、バクテリオファージの表面で発現される大量の結合分子を調製するための手順をかなり簡単にする。さらに、細胞（例えば、ハイブリドーマおよびB細胞）から抗体産生配列を単離するためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅（Saikiら、*Science* 239(1988):487-491）の使用は、結合特異性が単離され得るタイムスケールを早める大きな可能性がある。ファージ抗体発現ライブラリーは、バクテリオファージ発現ベクター中に増幅したVHおよびVL遺伝子を直接クローニングすることにより、容易に生成され得る。さらに、バクテリオファージを基礎とする組換え産生システムは、注文作成の抗体およびそのフラグメントを産生するための余地がある。例えば、結合機能とエフェクター機能との新規な組み合わせを有するキメラ分子、ヒト化抗体（例えば、ヒト定常ドメインと組み合わせたマウス可変領域、または、ヒトFR上に移植したマウス抗体CDR）、および新規な抗原結合分子を産生することが可能である。このファージを基礎とするシステムの重要な利点は、所望の結合特異性に対して直接的な組換え抗体を直接的にスクリーニングする能力があることである。

組換えVHおよびVLファージライブラリーを生成するにおいて、いくつかの問題について述べられる必要がある。例えば、マウスにおいて、約 $10^7$ の可能なH鎖

および $10^7$ の可能なL鎖がある。したがって、H鎖およびL鎖の $10^{14}$ の可能な組み合わせがあり、このような数の組み合わせのいずれかをテストするためには、約 $10^{14}$ クローンのライブラリーを生成し、そしてスクリーニングしなくてはならない。これについて、これまでは実際的な可能性はなかった。PCT/GB92/00883およびPCT/GB92/01755出願（これらは参考として本明細書中に援用されている）は、この問題を改善する多くのアプローチを開示している。これらの出願はそれぞれ、発明者らの国際出願 WO 92/01047の一部継続出願である。

さらに、抗体活性部位の加工のために既に開発されている多くの分子生物学的技術は、既述のファージ抗体ライブラリーアプローチと組み合わせて適用され得る。これらの技術には、CDR内残基の部位特異的変異誘発、すべてまたは一部のCDRのランダムアミノ酸配列への置換、CDR領域がCDR領域のライブラリーで本質的に置換されるCDRシャッフリングが挙げられる。pAbの使用もまた、全合成抗体の構築を可能にし得る。さらに、いくつかの合成配列（例えば、CDR）およびいくつかの天然由来の配列を有する抗体が作成され得る（例えば、PCT/BG92/06372を参照のこと）。例えば、V遺伝子レパートリーは、再配列されていないV遺伝子をDおよびJセグメントと組み合わせることによりインビトロで作成され得た。次いで、pAbのライブラリーは、抗原への結合により選択され、抗原結合ループまたはVドメインフレームワーク領域においてインビトロで過剰変異され、そして選択および変異誘発のさらなるラウンドに供され得る。

pAbは、抗原結合活性をコードする抗体遺伝子の選択において適用の範囲を有する。適用の1つの特に刺激的な領域は、触媒特性を有する抗体（触媒性抗体）の開発である。触媒性抗体は、Schochetmanらの米国特許第4,888,281号；Kimらの米国特許第4,963,355号；およびSchochetmanらの米国特許第5,037,750号に記載されており、これらはすべて本明細書中に参考として援用されている。これらに開示されているように、触媒性抗体は、酵素の触媒能力を抗体の結合能力とを兼ね備える。

現在までに記載されたすべての触媒性抗体は、モノクローナル抗体技術を用いて生成されている。そのプロセスの詳細は当業者に周知である。代表的な方法としては、第1に、適切な抗原でマウスを免疫することが挙げられる。抗原は、所



望の反応物；ペプチドまたは他のキャリア分子に結合した所望の反応物；反応中間体または反応物のアナログ；あるいは、産物または反応中間体であり得る。

本明細書で用いられる「アナログ」という用語は、異性体、ホモログ、遷移状態アナログ、または化学構造の点で反応物に十分に類似している他の化合物を包含し得る。このようなアナログに対して惹起された抗体は、反応物との免疫学的反応に関連し得るが、アナログの反応を必ずしも触媒しない。

多くの異なるタイプの抗体触媒がこの技術で開発されたが、所望の特異性についてのハイブリドーマを樹立しそしてスクリーニングするに必要な時間がかなり重要である。

所望の特異性が十分にまれである場合、この所望の特異性を回収するに十分なハイブリドーマ細胞株をサンプリングすることは实际的でないかまたは不可能であり得る。

さらに、現在は、完全なヒト触媒性抗体を作成するための適切なハイブリドーマを基礎とする技術はない。

本発明の方法はまた、ある生物学的機能の活性化を生じる切断を引き起こすために用いられ得る。

このような反応はペプチド結合の切断を包含するが、エステル結合またはグリコシド結合または他のタイプの結合も包含し得る。

生物学的機能の活性化を生じる生体分子の切断の1つの例は、インスリン依存性糖尿病の処置である。患者は、注射によりインスリンを自分で投与する。循環中へのインスリンの放出が天然の膵臓のインスリン放出の薬物速度論を模倣するインスリン処方物の開発へのこれまでの試みは、成功することが証明されていない。インスリンは、プロ型のプロインスリンで膵臓に存在し、その活性はインスリン自体よりも多くの桁数低い強さである。プロインスリンからインスリンへの変換を生じるペプチド結合に特異的な抗体プロテアーゼは、その速度論的特徴がプロインスリンと抗体プロテアーゼとの注射後にインビボでインスリンを放出させるように設計され得る。これはプロドラッグの活性化の例であり、この場合薬物は天然のタンパク質ホルモンである。プロドラッグは、生物学的機能の活性化または不活性化を生じる多くの治療的活性分子を包含し得る。プロ型は、薬物の

天然の改変またはその適切な合成改変のいずれかを利用し得る。低い活性（治療的に有用または毒性である）を有する適切な薬物誘導体は、適切な触媒性抗体で改変され、活性化形態に変換される。このプロセスの特定の例が、1989年5月4日に出願されたPCT/US89/01951に記載されており、これは本明細書中に参考として援用されている。

#### 発明の要旨

本発明の1つの目的は、化学反応速度を触媒的に上昇させ得る、ファージ上に提示される触媒性抗体を産生および単離する方法を提供することである。

本発明の他の目的は、以下に概説するいくつかの異なる方法の1つによってヒト触媒性抗体を産生することである。

本発明のさらなる目的は、遷移状態アナログ、ホスホネート、およびRT3に結合する抗体エピトープを提示するファージを単離することである。

本発明のさらに他の目的は、変異誘発、鎖シャッフリング、およびCDRシャッフリング、またはこれらの手順の種々の組み合わせを包含するいくつかの異なる方法の1つによって、遷移状態アナログ、ホスホネート、およびRT3を結合する抗体（マウスまたはヒト由来）から触媒性抗体を産生することである。

そして最後に、本発明のさらに他の目的は、プロドラッグ活性化に使用するための触媒性抗体を産生することである。

したがって、本発明は、ファージ上に提示される触媒性抗体を産生する方法を提供し、以下の工程を包含する：

- (a)抗体由来ドメインの遺伝子ライブラリーを生成する工程；
- (b)ファージ発現ベクター中に上記ドメインをコードするものを挿入する工程；および
- (c)上記触媒性抗体を単離する工程。

本発明はさらに、ファージ上に提示される触媒性抗体を単離する方法を提供し、以下の工程を包含する：

- (a)抗原を調製する工程；
- (b)上記抗原で免疫する工程；

- (c)上記免疫した動物からVHおよびVLドメインのライブラリーを生成する工程；
- (d)ファージディスプレイ抗体を生成するためにファージ発現ベクター中に上記VHおよびVLドメインをクローニングする工程；
- (e)上記抗原に特異的に結合するファージディスプレイ抗体を選択する工程；
- (f)基質に対する触媒活性について上記選択されたファージディスプレイ抗体をスクリーニングする工程；および
- (g)上記触媒性抗体を単離する工程。

本発明はさらに、ファージ上に提示される触媒ヒト抗体を単離する方法を提供し、以下の工程を包含する：

- (a)抗原を調製する工程；
- (b)VHおよびVLドメインのライブラリーを生成する工程；
- (c)ファージディスプレイ抗体を生成するためにファージ発現ベクター中に上記VHおよびVLドメインをクローニングする工程；
- (d)上記抗原に特異的に結合するファージディスプレイ抗体を選択する工程；
- (e)基質に対する触媒活性について上記選択したファージディスプレイ抗体をスクリーニングする工程；および
- (f)上記触媒性抗体を単離する工程。

本発明はさらに、鎖シャッフリングを介してファージ上に提示される触媒性抗体を産生する方法を提供し、以下の工程を包含する：

- (a)鎖シャッフリングされたライブラリーを形成するためにVL遺伝子のライブラリーをVH遺伝子と組み合わせる工程；
- (b)シャッフリングされた鎖をクローニングする工程；
- (c)ファージ上で上記触媒性抗体を発現させる工程；
- (d)抗原に対して選択する工程；および
- (e)触媒活性についてスクリーニングする工程。

本発明はさらに、CDRシャッフリングを介してファージ上に提示される触媒性抗体を産生する方法を提供し、以下の工程を包含する：

- (a)VLおよびVH遺伝子を単離する工程；

- (b) CDR領域のライブラリーを単離する工程；
- (c) CDRシャッフルされたライブラリーを生成するために上記VLおよびVH遺伝子を上記CDR領域のライブラリーと再度組み合わせる工程；および
- (d) 上記CDRシャッフルされたライブラリーをクローニングする工程；
- (e) フェージ上で上記CDRシャッフルされたライブラリーを発現させる工程；
- (f) 抗原に対して選択する工程；および
- (g) 触媒活性についてスクリーニングする工程。

本発明はさらに、インプリンティングを介してフェージ上に提示される触媒性抗体を産生する方法を提供し、以下の工程を包含する：

- (a) 抗体のセットを選択する工程；
- (b) 上記抗体からVH遺伝子のセットおよびVL遺伝子のセットを単離する工程；
- (c) 2つの組み合わせライブラリーを形成するために、上記VHのセットをVLのライブラリーと組み合わせ、そして上記VLのセットをVHのライブラリーと組み合わせる工程；
- (d) 上記組み合わせライブラリーをクローニングする工程；
- (e) 上記ライブラリーをフェージ上で発現させる工程；
- (f) 抗原に対して選択する工程；
- (g) VHおよびVL遺伝子の選択されたライブラリーを単離する工程；
- (h) 上記VHおよびVL遺伝子のライブラリーを組み合わせる工程；
- (i) 上記組み合わせられたライブラリーをクローニングする工程；
- (j) 上記組み合わせられたライブラリーをフェージ上で発現させる工程；
- (k) 抗原に対して再選択する工程；および
- (l) 触媒活性についてスクリーニングする工程。

本発明はさらに、インビボで分子内の特定の結合の切断または形成速度を上昇させる方法を提供し、フェージ由来の触媒性抗体の有効量を動物に導入する工程を包含する。

本発明はさらに、プロドラッグのインビボでの活性化の方法を提供し、以下の工程を包含する：

- (a) プロドラッグを患者に導入する工程であって、上記プロドラッグが、切断

されて、この薬物の活性形態を放出する化学結合を有する、工程；および

(b)上記プロドラッグ中の上記結合を切断し得るファージ由来の触媒性抗体の有効量を上記患者に導入する工程。

#### 図面の簡単な説明

請求の範囲に定義される本願発明は、本明細書および図面を参照してより容易に理解され得る。

図1から図4は、それぞれ、化合物7(RT3ハプテン)、化合物8、化合物12および化合物15およびそれらの中間体の合成の反応スキームを示す。

図5は、His-6オリゴをpHEN-OX16に挿入してpHEN-OX16his11を作製する、プラスミド構築物を示す。

図6はクマーシーで染色したSDSポリアクリルアミドゲルを示す：

(a)1mlの細胞からの全ペリプラズムタンパク質。

(b)結合マトリックス添加後の、1mlの細胞の非結合画分。

(c)1mlの細胞に相当する、マトリックスに結合し溶出した画分。

(d-f)は5mlの細胞に相当する精製した画分である。

(d)PBS+1M NaCl、250mMイミダゾールで溶出したpOX16-his-11抗体フラグメント。

(e)PBS、250mMイミダゾールで溶出したpOX16-his-11抗体フラグメント。

(f)PBS+1M NaCl、250mMイミダゾールで溶出したpSCFv4his-6抗体フラグメント。

図7は、C末端his-6ペプチドをコードするpCANTABベクターを示す。

図8は、選択されたマウスRT3ファージ抗体とハプテン(RT3)、ハプテン部分(RT3AおよびRT3B)、あるいは産物の部分(Prod AおよびProd B)との競合アッセイ結果を示す。

図9は、マウス由来RT3ファージ抗体からの、軽鎖パターンAおよび軽鎖パターンCの遺伝子配列を示す。

図10は、マウス由来RT3ファージ抗体からの、軽鎖パターンB、D、およびIの遺伝子配列とマウス生殖系列との整列を示す。

図11は、マウス由来RT3ファージ抗体からの、軽鎖パターンA、B、C、D、およびIの遺伝子配列の比較を示す。

図12は、マウス由来RT3ファージ抗体からの、重鎖パターンAの遺伝子配列を示す。

図13は、マウス由来RT3ファージ抗体からの、重鎖パターンB、およびDの遺伝子配列とマウス生殖系列との整列を示す。

図14は、マウス由来RT3ファージ抗体からの、重鎖パターンA、B、C、D、およびIの遺伝子配列の比較を示す。

図15Aは、クローン18からのIMACで純粋なscFvの触媒性アッセイのHPLCクロマトグラムを示す。

図15Bは、クローン18からのIMACで純粋なscFvの触媒性アッセイ（+RT3ハプテン）のHPLCクロマトグラムを示す。

図15Cは、pH 9.0での触媒性RT3アッセイのブランクのHPLCクロマトグラムを示す。

図16は、クローン18からのHICで純粋なscFvの触媒性アッセイのHPLCクロマトグラムを示す。

図17Aは、クローン83からのIMACで純粋なscFvの触媒性アッセイのHPLCクロマトグラムを示す。

図17Bは、クローン83からのIMACで純粋なscFvの触媒性アッセイ（+RT3ハプテン）のHPLCクロマトグラムを示す。

図18は、クローン83からのHICで純粋なscFvの触媒性アッセイのHPLCクロマトグラムを示す。

図19Aは、未処置のヒト由来ファージ抗体ライブラリーの3ラウンドのパンニングの後に得られたRT3に対するクローンの結合パターンを示す。

図19Bは、未処置のヒト由来ファージ抗体ライブラリーの4ラウンドのパンニングの後のRT3に対するクローンの結合パターンを示す。

図20は、未処置のヒト由来ファージ抗体ライブラリーから選択されたRT3特異的ファージ抗体の重鎖および軽鎖の遺伝子配列を示す。

図21は、VH鎖およびVL鎖シャッフリングの一般的なスキームを示す。

図22は、PAN0、PAN1、およびPAN2後のヒトのシャッフルされたライブラリーに由来するポリクローナルファージを用いるRT3-BSA ELISAアッセイを示す。

図23Aは、RT3ハプテンの左側部(RT3A)あるいは基質(Product A)によるファージ抗体のRT3-BSAへの結合の阻害を示す。

図23Bは、RT3ハプテンの右側部(RT3B)あるいは基質(Product B)によるファージ抗体のRT3-BSAへの結合の阻害を示す。

図24Aは、0.3 $\mu$ gのRT3-BSAでコートしたELISAウエルからRT3、RT3A、RT3B、TEA、およびPBSで溶出したファージの収率を示す。

図24Bは、15 $\mu$ gのRT3-BSAでコートしたELISAウエルからRT3、RT3A、RT3B、およびTEAで溶出したファージの収率を示す。

本願明細書に記載される発明をより十分に理解し得るために、以下に詳細な説明を記載する。この記載は、本願発明を例示して説明するが、特定の発明に限定すると解釈すべきでなく、当業者の範囲内にある変法は、本願発明の範囲に属すると考えられるべきである。

#### 好適な実施態様の詳細な説明

便宜のためおよび即座に参照できるために、本願発明を記載するにおいて以下の定義を用いる。

アナログは、異性体、ホモログ、遷移状態、あるいは化学構造の点で反応物に十分に類似している他の化合物を包含する。このようなアナログに対して惹起された抗体は、反応物との免疫学的反応に関連し得るが、アナログの反応を必ずしも触媒しない。

抗体は、天然か、一部あるいは全部が合成的に生成された免疫グロブリンをいう。この用語はまた、免疫グロブリン結合ドメインと相同な結合ドメインを有するあらゆるタンパク質を含む。これらのタンパク質は天然供給源に由来し得るか、あるいは一部あるいは全部が合成で生成され得る。例示の抗体は、免疫グロブリン同位体およびFab、F(ab1)<sub>2</sub>、scFv、fV、dAb、Fdフラグメントである。

抗体由来ドメインは抗体分子に由来する配列をいう。

抗原は、動物体を抗体を産生させるように刺激し得、これらの産生された抗体

と結合し得る物質であり、だいたいタンパク質である。

ドメインは、タンパク質の一部であって、それ自身の中に折り畳まれ、同じタンパク質の他の部分とは独立しており、相補的な結合メンバーとは独立している。

ホモログは、一次構造、二次構造、または三次構造中の対応する位置で同じ残基あるいは保存された残基を有するポリペプチドである。この用語はまた、相同なポリペプチドをコードする2つあるいはそれ以上のヌクレオチド配列をも含む。相同なポリペプチドの例は、免疫グロブリン同位体である。

単離は、ライブラリーから特定のファージを分離することをいう。

ライブラリーはオリゴヌクレオチドあるいはポリヌクレオチド（例えば、クローニング中のDNA配列）のコレクションをいう。

未処置のライブラリーは、未だ免疫化されていない動物に由来する免疫グロブリン配列のファージディスプレイライブラリーをいい、免疫化は以下のもので行われる：反応物；ペプチドあるいは他のキャリアに結合した反応物；反応中間体；反応物のアナログ；産物のアナログであって、そのようにして生成された抗体が反応物あるいは反応中間体に結合し得る、アナログ；および反応中間体あるいは遷移状態のアナログ。

パッケージは、複製し得る遺伝子ディスプレイパッケージをいい、粒子がその表面にsbpのメンバーを提示しているものをいう。このパッケージは、その表面に抗原結合ドメインを提示するバクテリオファージであり得る。このタイプのパッケージはファージ抗体(pAb)と呼ばれている。

ファージベクターはファージゲノムの修飾に由来するベクターであり、バクテリオファージの複製開始点を有するが、プラスミドの複製開始点を有しない。

ファージミドベクターはプラスミドゲノムの修飾に由来するベクターであり、バクテリオファージの複製開始点およびプラスミドの複製開始点を有する。

ベクターは宿主生物中で複製し得るDNA分子であって、その中に遺伝子が挿入されて、組換えDNA分子が構築される。

#### 方法の概観

本願発明は、触媒特性を有する抗体をその表面に発現するファージ粒子を作製



し単離する方法を記載する。本願発明を実施する際に、触媒機能性をコードする抗体ドメインは、以下に定義するように、特異的に免疫したあるいは免疫していない動物供給源あるいはヒト供給源のいずれかから調製され得る。さらに、本願発明は、結合および/または触媒機能を、いくつかの方法（鎖シャッフリング、CDRグラフト化、および変異誘発を含むがこれに限定されない）の一つにより生成あるいは改良する方法を記載する。本願発明のさらなる実施態様においては、マウス由来VHおよびVLドメインによって全体的にコードされている触媒性抗体を、ヒト由来VHおよびVLドメインによってコードされている触媒性抗体に変換する方法を開示する。

特異的な触媒機能を有する抗体を生じさせる最初の工程は、化学物質ハプテン（例えば、触媒される反応の基質とは関連するが異なっている遷移状態アナログ（TSA））を必要とするが、必ずしもこのハプテンに限定されない。触媒機能を有する抗体を生じさせる手段としてのこのTSAの構造、合成、および使用は、1980年4月1日に発行された米国特許第4,196,265号に記載されており、参考として本願明細書に援用する。先行技術に記載されているように、触媒性抗体の産生および単離の伝統的な方法は、モノクローナル抗体によるアプローチ（ハイブリドーマ技術）で行われている。

本願発明は、ホスホネート遷移状態アナログを免疫原としてあるいは固相上に固定化して用いて、そのTSAと結合しかつ触媒特性を有し得る抗体の生成および選択を可能にする（図1参照）。ハイブリドーマ法を用いて触媒性抗体が産生される以前の発明と異なって、本願発明のユニークな実施態様はバクテリオファージの表面に抗体ドメイン（触媒機能を有する抗体ドメインを含む）を発現し得ることにある。表面に触媒性抗体ドメインを提示する能力を有するファージライブラリーを作製する方法を、以下に記載する。

#### 1. 免疫化供給源からの結合および/または触媒性ファージ抗体の産生

TSAをキャリア分子あるいはペプチドに結合させ、BALB/Cマウスを免疫した。適当な期間の経過後、マウスから脾臓を取り出し、細胞からmRNAを単離した。RNAを免疫グロブリンの可変ドメインを増幅させる出発供給材料として用い、バク

テリオファージ発現ベクターへのクローニングおよび引き続くバクテリオファージ粒子の表面上での発現を行う。本願発明の実施態様において、可変ドメインは、本願発明の背景に記載されるように、典型的には短いペプチドにより連結されてscFvを生成している。別のファージ発現ベクターがFabのような抗体を発現させるのに用いられ得ることに注目すべきである。このファージ抗体ライブラリーを作製する技術は既に記載されており、そのプロセスの詳細は当業者に周知である（例えば、WO 92/01047; McCaffertyら、Nature(1990):552-564; Hoogenboomら、Nucl. Acids. Res.(1991)4133-4137; Marksら、J. Mol. Biol.(1991):581-597を参照のこと）。

TSAと特異的に結合し認識するファージ抗体は、以下に記載するいくつかの方法の一つを用いてライブラリーから単離される：

a)パンニング-TSAを直接、固相表面（すなわち、チューブまたはプレート）上に固定化するか、または別途、この固相表面をコートする前にキャリアタンパク質と結合させる。ファージ抗体のライブラリーを含む懸濁液をコートされた表面とある時間反応させ、その後、結合していないファージ抗体（TSAと結合しない抗体）を洗浄して除いた。

b)アフィニティークロマトグラフィー TSAを適切なカラムマトリックスに（すなわち、セファロース）に結合させる。ファージ抗体懸濁液をカラムに通し、結合しないファージを緩衝液でカラムから洗い流した。

固相表面に結合し固定化されるファージ抗体は、以下を含むいくつかの方法のうちの一つで取り出され得る：

a)低い（酸性）あるいは高い（塩基性）pHのいずれかのバッファーを用いる非特異的溶出；

b)もとのホスホネートTSAまたは反応基質または産物などの遊離のハプテンを用いる特異的溶出；

c)TSAの部分、または基質または産物を用いる特異的溶出。

TSAに結合したファージ抗体の特異的溶出に加えて、最初のパンニングまたはアフィニティークロマトグラフィー工程の間に、ファージ抗体の結合をコントロールすることが望ましいとされ得る。一つの方法は競合阻害を用いることであり

、

ファージ抗体をまず、反応物、反応産物またはTSAの部分と予めインキュベートしておくことである（実施例9を参照）。このような「予備選択」の目的は、触媒的でないと思われる抗体を結合抗体の集団から除くことにある。本願発明の実施例においては、これらの除かれたものはTSAのホスホネート部分と実質的に結合しないファージ抗体である。ファージ抗体ライブラリーの予備選択のタイプは実験的に決定される必要があるが、結局は、TSA結合ファージ抗体の集団の中で、触媒性ファージの比率を非触媒性ファージに対して増加させる方法となり得る。このような手順がELISAウエルで行われる場合は、より高い適応性が与えられ得る。このように、特定の手順に従って、溶出物を集め得、プレート全体に検出手順を適用し得る。結果に基づいて、特定のウエルからの溶出物を選択して、さらに分析/パンニングに供し得る。

上記方法のいずれかあるいは全てによるファージ抗体の溶出に続いて、ファージを集め、そしてTSA固相上での先のパンニングと再インキュベートから溶出したファージを単に集めることによって、追加のパンニング（2 3 4 5など）に供し得る。TSAに特異的に結合しないファージのある割合(%)はそれぞれのパンニング工程（すなわち、非特異的結合体）を通して行われるので、ファージクロンのプールまたは個々に単離されたファージクロンは、典型的には、固相ELISAアッセイによって、TSAへの結合に関して再度スクリーニングされる。ELISAアッセイは、バクテリオファージ表面に発現される抗体または可溶性形態で発現される抗体を用いて、以下に述べるように行われ得る。ELISAアッセイの別の形式、例えば、遊離のハプテン、このハプテンの基質または産物または種々の半分あるいは部分、基質または産物を用いる競合阻害は、ファージクロンのプールまたは個々の結合クロンの結合特異性をさらに特徴付けるために用いられ得る。

適切な結合特異性を有する個々のファージ抗体クロンまたはクロンのプールは、次に触媒活性に関してアッセイされる。触媒に関するアッセイは最も便利には可溶性の抗体を用いて行われ、ファージ抗体発現E.coliクロンから可溶性抗体を産生させる方法はすでに記載されている(Marksら、*J. Mol. Biol.* (1991):

581-597)。触媒活性が抗体活性部位にあるとする基準は、混入タンパク質または酵素からの抗体の厳しい精製にある。本願発明においては、可溶性抗体の精製は、

発現した抗体の3'カルボキシ末端に特異的なペプチドを導入することにより容易とされる。現在用いられているおよび先行技術に記載されているこのようなペプチドの例は、以下を含む：

a) ヒスチジンペプチド-カラムマトリックスに固定化された金属での抗体の精製を可能にする (IMAC、Hochuliら、Bio/Technology(1988):1321-1325)。

b) mycペプチド-mycペプチドに特異的に結合する抗体が固定化されているカラムマトリックスでの精製を可能にする (Clacksonら、Nature(1991):624-628)。

抗体フラグメントを提示するのに使用される従来のベクターは、mycペプチドのみを含んでいた (図5参照)。本願に記載され開示されているベクターは、ヒスチジンペプチドをmycペプチドに直列して導入した最初の例を示す。これは、従来技術の改良を示すが、それは、2つの独特の異なる形式と精製条件とを用いる、可溶性抗体の精製を可能にするからである。

抗体のさらなる精製は、目的の抗体に独特の特異的な特性 (例えば、疎水性、電荷、およびサイズ) を利用して行い得る。精製は、すでに記載されているように、多くの標準的なタンパク質精製技術のいずれかにより影響を与えられる (Deutscher、Methods in Enzymology, 182巻, Guide to Protein Purification(1990))。

上記のファージ抗体技術により単離された抗体は、当業者に周知の多くの方法により目的の反応を触媒し得る能力についてスクリーニングされ得る。その最も単純な形態では、スクリーニングは、抗体と反応物 (基質) とを適切な条件下でインキュベートし、例えば分光学的方法あるいは高圧液体クロマトグラフィーなどの多くの手段のいずれかによって反応産物の形成を測定することにより、達成される。

## 2. 非免疫化供給源からの結合および/または触媒性ファージ抗体の産生

本発明のこの実施態様において、ファージ抗体ライブラリーを生成させるため

の供給材料は、非免疫化動物または哺乳動物（例えばヒト）由来である。本実施例における非免疫化は、特異的な反応物（キャリアタンパク質に結合しているかまたは遊離の反応物としてのいずれか）、反応中間体、反応物のアナログまたは

特定の反応の予想される産物で特異的に免疫化されないことを意味する。先行技術において示されるように、低親和性ヒト抗体および中親和性ヒト抗体が、非免疫化供給源から生成されたファージ抗体ライブラリーを用いて、特異的な抗原に対して生成されている。そのようなアプローチは、TSAに結合する動物またはヒト抗体を、上記のように単に未処置の動物またはヒト由来ファージ抗体ライブラリーをTSA上にパンニングすることにより生成する方法を提供する。次いで、TSAを特異的に結合および認識するファージクローンを、上記のように所望の触媒機能についてアッセイし得る。そのようなアプローチは、ヒト由来触媒性抗体を直接的および全体的に単離する方法を提供する。

### 3. 鎖シャッフリングによる結合および/または触媒性ファージ抗体の産生

ファージ抗体ライブラリーを生成するための鎖シャッフリングアプローチは、VHおよびVK対の間の結合の無差別性を利用する。本発明のこの実施態様において、1つ、いくつか、または多数の異なるファージ抗体クローン由来のVHまたはVKドメインを、VKまたはVHドメインのライブラリーと再度組み合わせる。VHおよびVKドメインのファージクローンおよびライブラリーは、上記の第1節に記載のように免疫化した供給源または上記の第2節に記載のように非免疫化供給源から得られ得る。さらに、鎖シャッフリングのために選択されるファージクローンは、以前特定のTSAへの結合について選択されたファージクローンであり得るが、必ずしもそれに限定されない。鎖シャッフリング手順の後、再度組み合わせた鎖（すなわちシャッフルされた鎖）をファージ抗体発現ベクターにクローン化し直す。発現されたファージ抗体ライブラリーをTSA上に再度パンニングし、そして個々の結合クローンを先に記載のように触媒活性についてスクリーニングする。

### 4. CDRシャッフリングによる結合および/または触媒性ファージ抗体の産生

抗体特異性および抗原結合親和性はVHおよびVLドメインによりコードされる6つのCDRにより特定されることが周知である。それで、所定の抗体由来のCDRのい

ずれかまたはすべてを変化させることはその抗体の結合特性に劇的な効果を有することになる。ファージ抗体に関する場合のCDRシャッフリングは、VHまたはVL

ドメイン内のCDR（単数または複数）をコードする領域をCDR（単数または複数）のライブラリーで置換するためのプロセスを描写する。上記の第3節に記載の鎖シャッフリングアプローチと同様に、CDRシャッフリングのために使用されるVHまたはVKドメインは、1つ、いくつか、または多数の異なるファージ抗体クローン由来であり得る。シャッフリングのために使用されるCDR領域のファージクローンおよびライブラリーは、免疫化供給源または非免疫化供給源のいずれかから得られ得る。CDRシャッフリングの後、組換えVHおよびVLドメインをファージ抗体発現ベクターに再クローン化する。発現されるファージ抗体をTSAに対して再度パンニングし、そして個々の結合クローンを上記のように触媒活性についてアッセイする。

#### 5. 変異誘発による結合および/または触媒性ファージ抗体の産生

CDRシャッフリングについて上記したように、抗体の結合特異性は、CDR内にコードされるアミノ酸を変化させることにより変化し得る。本発明の目的のためのCDR変異誘発は、以下のように定義され得る：

a) 特定のCDR内の1つまたは少数個の特異的なアミノ酸を変異誘発させる部位特異的。このプロセスは通常、変異誘発される領域のヌクレオチド配列および変異誘発プライマーの配列に依存して、野生型アミノ酸配列のいくつかの異なるアミノ酸への変化を生じる。

b) CDR（単数または複数）内のいくつかまたはすべてのアミノ酸がランダムなヌクレオチド配列で置換され、その結果野生型配列がアミノ酸のすべての可能な組み合わせにより置換されるランダム変異誘発。

部位特異的変異誘発およびランダム変異誘発のための多数の異なる方法が文献に記載されており、そして当該分野において周知である。その他の方法と同様に、変異誘発のために選択されるファージ抗体クローン（単数または複数）は、TSAへの結合について既に選択されたクローンであり得るが、それに限定されない。さらに、選択された結合クローンは、免疫化または非免疫化のいずれかの動物

またはヒト供給源由来のファージ抗体ライブラリーから単離されるクローンであり得る。

抗原結合部位のモデリングにおける近年の成功は、良好に新たな設計を预言する。このアプローチは、特に小さい基質に対する触媒性抗体を作製するために特に魅力的である。ここで、側鎖または補欠分子族のための結合部位が、基質の遷移状態に選択的に結合するためのみならず、結合の作製および破壊に直接関係するためにも導入され得る。

#### 6. 「インプリンティング」によるヒト触媒性抗体の誘導

「インプリンティング」のプロセスは、所望の結合特徴を有する既存の抗体を用いて類似の特徴を有する新たな抗体を誘導する工程を包含する。これは、もとの抗体鎖またはその部分を相補的な部分のライブラリーと組み換えることにより行われる。新たな抗体エレメント（もとの抗体結合特徴を相補する）が見出されると、これらをもとの抗体結合特徴を置換するライブラリーと再度組合せ、これらをもとの抗体部分を置換するライブラリーと再度組合せ、もとの抗体の結合を模倣する完全に新たな抗体を得る（PCT/GB/92/01755）。

例えば、インプリンティングアプローチは、上記第1節に記載のファージ抗体技術を用いて単離されたマウス触媒性抗体のヒト化に対して価値を有する。一旦単離されれば、触媒性抗体のマウスがコードするVHまたはVLドメインを、相補的なヒト由来VLまたはVHドメインのライブラリーと再度組合せ得る。次いで、半マウス-半ヒトファージ抗体を、触媒活性を生成するために、もともと使用したTSAへの結合について再度選択する。選択されるバインダーの残存するマウスVHまたはVLドメインが、今や相補的なヒト由来VLまたはVHドメインのライブラリーで置換される。今やヒト由来の配列で完全にコードされる生じるファージ抗体を、TSAに対する結合について再度選択する。次いで、TSAへの結合について選択された個々のクローンを上記のように触媒活性についてアッセイする。

今、一般的に本発明を記載したが、以下の実施例は例示の目的のために含まれ、いかなる限定形態をも意図しない。

### 実施例1.1

#### RT3ホスホネート遷移状態アナログハプテンの合成

RT3ホスホネート遷移状態アナログハプテンの合成についての反応スキームを図1に示す。アセトン中のヨウ化ナトリウムを用いるハロゲン交換によって $\alpha$ -2-クロロイソジュレン(1)から $\alpha$ -2-ヨードイソジュレン(2)を得た。トリメチルホスファイトを用いるMichaelis-Arbusov反応によって、ジメトキシホスホネート化合物(3)を得た。五塩化リンとともに加熱して活性化し、次いでメチル4-ヒドロキシフェニルアセテート(4)と反応させて化合物(5)を得た。チオフェノールおよびトリエチルアミンを用いる脱メチル化により、化合物(6)を得た。この化合物を水酸化リチウムの強塩基条件下で完全に脱保護して所望の生成物(7)にした。

さらに詳細には、 $\alpha$ -2-ヨードイソジュレン(化合物2)は、以下のようにして調製された：

$\alpha$ -2-クロロイソジュレン(化合物1)(2.28g)をアセトン(45ml)中に溶解し、そしてNaI(2.25g)を加えた。反応混合物を75℃、暗所で、16時間、激しく撹拌した。反応混合物を濃縮し、酢酸エチル(100ml)に再溶解し、水で洗浄し、そして濃縮して固体にした。この固体を酢酸エチル(5ml)に再溶解し、そして100gのシリカを用いてヘキサンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、 $\alpha$ -2-ヨードイソジュレン(2)(2.717g)を得た。これを以下の分光法により確認した。

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)} \delta$  2.25 (s, 3H), 2.33 (s, 6H), 4.48 (s, 2H), 6.85 (s, 2H).

#### 化合物3の調製

新たに蒸留したトリメトキシホスファイト(5ml)および $\alpha$ -2-ヨードイソジュレン(2)(0.765g)を共に110℃で16時間加熱した。反応混合物を濃縮して少容量にし、そして50gのシリカを用いて酢酸エチル-ヘキサン(2:8容量比)で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、化合物3(0.550g)を得た。これを以下の分光法により確認した。



$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.25 および 2.27 (2s, 3H), 2.40 (1s, 6H), 3.25 (d, 2H), 3.65 (d, 6H), 6.88 (s, 2H).

メチル4-ヒドロキシフェニルアセテート(化合物4)

4-ヒドロキシフェニル酢酸(1.75g)をメタノール(30ml)に溶解し、そして10Mの塩酸水溶液(0.15ml)を添加し、そして15時間加熱還流した。室温まで冷却した後、トリエチルアミン(1ml)を添加し、混合物を濃縮し、そしてシリカゲル(30g)を用いて酢酸エチル-ヘキサン(2:8 容量比)で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、メチル4-ヒドロキシフェニルアセテート(4)(1.693g)を得た。これを以下の分光法により確認した。

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.58 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 6.75 (d, 2H), 7.10 (d, 2H).

化合物5の調製

化合物3(0.243g)を乾燥クロロホルム(3ml)に溶解し、そして五塩化リン(0.240g)の乾燥クロロホルム溶液(3ml)を添加し、次いで60℃で3時間加熱した。反応混合物を濃縮してオイルにし、このオイルを高減圧下で16時間撹拌しなから放置した。得られたホスホクロリデート(phosphorochloridate)を乾燥ジクロロメタン(3ml)に再溶解し、そしてこれをメチル4-ヒドロキシフェニルアセテート(4)(0.150g)と4-ジメチルアミノピリジン(0.146g)との乾燥ジクロロメタン(3ml)溶液に0℃で添加した。反応混合物を室温で16時間撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液(15ml)を添加し、そして生成物をジクロロメタン(40ml)中に抽出した。有機層を水(10ml)で洗浄し、無水 $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過し、そして濃縮し、次いでシリカ(30g)を用いて酢酸エチル-ヘキサン(4:6 容量比)で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、化合物5(0.20g)を得た。これを以下の分光法により確認した。

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.27 および 2.30 (2s, 3H), 2.40 and 2.42 (2s, 6H), 3.40 (d, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.67 (d, 3H), 3.69 (s, 3H), 6.88 (s, 2H), 7.05 (d, 2H), 7.20 (d, 2H).

化合物6の調製

化合物 5 (0.19g) をジオキサン (1.5ml) に溶解した。チオフェノール (0.575g) およびトリエチルアミン (0.70ml) を添加し、そして反応混合物を 16 時間撹拌した。混合物を濃縮し、水 (30ml) に再溶解し、そしてジクロロメタン (5 × 25ml) で洗浄した。水層を HCl 水溶液で pH 1 調整し、そして酢酸エチル (5 × 30ml) で抽出した。有機層を一緒にし、無水 MgSO<sub>4</sub> 燥し、濾過し、そして濃縮して化合物 6 (0.176g) を得た。これを以下の分光法により確認した。

<sup>1</sup>H

NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.15 (bs, 3H), 2.28 (bs, 6H), 3.13 (d, 2H) 3.40 (bs, 2H), 3.60 (bs, 3H), 6.68 (bs, 2H), 6.85 (bs, 2H), 7.00 (bs, 2H).

#### 化合物 7 の調製

化合物 6 (0.087g) を、メタノール (1.4ml) および水 (0.30ml) 中の水酸化リチウム 1 水和物 (0.025g) の溶液で 50 時間激しく撹拌して処理した。反応混合物をその体積が 3 分の 1 になるまで濃縮し、水 (10ml) を添加し、そして水層をジクロロメタン (3 × 10ml) で洗浄した。水層を濃 HCl を用いて pH 1 に調整し、そして酢酸エチル (7 × 20mL) で溶出した。有機層を一緒にし、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、そして濃縮して、化合物 7 (0.063g) を得た。これを以下の分光法により確認した。

<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) δ 2.170

2.175 (2s, 3H), 2.30 (s, 6H), 3.20 (d, 2H), 3.50 (s, 2H), 6.80 (s, 2H), 7.00 (d, 2H), 7.20 (d, 2H).

#### 実施例 1.2

RT3 ホスホネート 遷移状態 アナログ (RT3A) の左側部分 (化合物 8) の合成 (図 2 を参照のこと)

チオフェノールおよびトリエチルアミンを用いる化合物 3 の脱メチル化からの化合物 8 の調製

化合物 3 (0.122g) をジオキサン (1.5ml) に溶解し、そしてチオフェノール (0.55g) のジオキサン (1.5ml) 溶液を撹拌しながら添加した。次いで、トリエチルアミ

ン(0.70ml)を添加し、そして溶液を室温で24時間攪拌した。反応混合物を分液ロートに移し、水(50ml)を加え、水層をHCl水溶液でpH7に調整し、次いでこの溶液をジクロロメタン(5×50ml)で洗浄した。水層を1M HCl水溶液でpH1に酸性化し、そして酢酸エチル(2×75ml)で抽出した。有機層を一緒にし、そして水(5ml)で洗浄し、無水MgSO<sub>4</sub>を用いて乾燥し、濾過し、濃縮した。シリカ(10g)を用いてメタノール-ジクロロメタン(8:92容量比～15:85容量比)で溶出して精製し、化合物8(0.055g)を得た。これを以下の分光法により確認した。

<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) δ 2.10 (bs, 3H), 2.28 (bs, 6H), 3.2 (d, 2H), 3.30 (d, 3H), 6.85 (s, 2H).

### 実施例1.3

RT3ホスホネート遷移状態アナログ(RT3A)の右側部分(化合物12)の合成(図3を参照のこと)

ジベンジルメチルホスホレート(化合物9)の調製

水素化ナトリウム(鉱油中の60%分散体)(0.16g)を乾燥ヘキサン(2×10ml)で洗浄した。デカントして得られる固体に、乾燥THF(5ml)を添加し、そして攪拌した懸濁液を0℃まで冷却した。ジベンジルホスファイト(1.048g)の乾燥THF(5ml)溶液を添加し、そして混合物を室温まで加温した。30分後、ヨウ化メチル(0.32ml)を添加し、そして反応混合物を2時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、酢酸エ

チル(75ml)に再溶解し、飽和塩化アンモニウム水溶液(50ml)および水(10ml)で洗浄した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、濃縮し、次いでシリカ(10g)を用いて酢酸エチル-ヘキサン(1:1 容量比)で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、ジベンジルメチルホスホネート(9)(0.750g)を得た。これを以下の分光法により確認した。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.48 (d, 3H), 5.00 (m, 4H), 7.40 (s, 10H).

ベンジルメチルリン酸(化合物10)の調製

ジベンジルメチルホスホネート(9)(0.277g)をジオキサン(1ml)および水(0.5ml)に溶解した。2M LiOH水溶液(1ml)を添加し、そして混合物を48時間激しく攪拌した。水(25ml)を添加し、水層を酢酸エチル(25ml)で洗浄した。水層を濃HClを用

いてpH1に酸性化し、酢酸エチル(2×35ml)で抽出した。有機層を一緒にし、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、そして濃縮して、ベンジルメチルリン酸(10)(0.183g)を得た。これを以下の分光法により確認した。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.53 (d, 3H), 5.08 (d, 2H), 7.40 (m, 5H), 11.90 (s, 1H).

#### 化合物11の調製

ベンジルメチルリン酸(10)(0.118g)を塩化チオニル(1ml)に溶解し、4時間攪拌した。反応混合物を濃縮して乾燥させ、高減圧下に16時間放置した。これを乾燥ジクロロメタン(1ml)およびDMF(1.5ml)に溶解した。攪拌しながら、メチル4-ヒドロキシフェニルアセテート(4)(0.083g)およびトリエチルアミン(0.170ml)を添加した。16時間後、飽和塩化アンモニウム水溶液(30ml)を添加し、そして混合物を酢酸エチル(2×50ml)で抽出した。有機抽出物を一緒にし、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、そして濃縮した。分取tlcプレート(1mm)を用い、そして酢酸エチル-ヘキサン(4:6 容量比)を溶媒として用いて精製を行い、化合物11(0.068g)を得た。

これを以下の分光法により確認した。

<sup>1</sup>H NMR

(CDCl<sub>3</sub>) δ 1.67 (d, 3H), 3.60 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 5.15 (m, 2H), 7.13 (d, 2H), 7.25 (d, 2H), 7.40 (s, 5H).

#### 化合物12の調製

ジベンジルホスファイトをヨウ化メチルを用いてメチル化し、ジベンジルメチルホスホネート(9)を得た。これを水酸化リチウムで加水分解し、リン酸10を得た。塩化チオニルを用いて活性化し、次いでメチル4-ヒドロキシフェニルアセテート(4)と反応させて化合物11を得た。11を接触水素化することにより、最終生成物(12)を得た。

化合物11(0.060g)を酢酸エチル(10ml)に溶解し、10%パラジウム-活性炭(0.03g)を添加した。混合物を水素雰囲気下、3時間攪拌した。次いで、これをセライトのベットを通して濾過し、酢酸エチル(2×10ml)を添加して、セライトから生成物を洗浄した。全洗浄物および濾液を一緒にし、そして濃縮して化合物12(0.0

38g)を得た。これを以下の分光法により確認した。

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)}$   $\delta$  1.48

(vbs, 3H), 3.60 (bs, 2H), 3.68 (bs, 3H), 7.15 (m, 4H), 8.20 (vbs, 1H).

#### 実施例1.4

RT3基質の合成(図4を参照のこと)

4-ヒドロキシフェニルアセトアミド(化合物13)の調製

メチル4-ヒドロキシフェニルアセテート(4)(0.83g)を飽和アンモニアメタノール溶液(30ml)に溶解し、そしてテフロンスクリュウキャップを有する肉厚のチューブに入れた。この溶液を室温で72時間、この密封チューブ中で攪拌した。反応混合物を濃縮し、そしてメタノールクロロホルム(2:8 容量比、75ml)に再溶解した。結晶化は起こらなかったため、溶液をその体積が半分になるまで濃縮し、そしてヘキサンを添加して加熱した。0℃まで冷却し、4-ヒドロキシフェニルアセ

トアミド(13)(0.524g)の結晶を得た。これを以下の分光法により確認した。

$^1\text{H NMR (d}_6\text{ DMSO + CF}_3\text{CO}_2\text{D)}$   $\delta$  3.23 (s, 2H), 6.63 (d, 2H), 7.00 (d, 2H).

化合物15の調製

メチルエステル4をアンモニア分解することにより、アミド13を調製した。メシチル酢酸を塩化チオニルを用いて活性化し、次いでアミド13と反応させ、最終生成物15を得た。

メシチル酢酸(0.10g)を塩化チオニル(1ml)に溶解し、そして4時間攪拌した。反応混合物を濃縮して乾燥し、そして高減圧下に16時間置いた。得られたメシチルアセチルクロリド(14)を乾燥ジクロロメタン(1ml)に溶解し、そして4-ヒドロキシフェニルアセトアミド(13)(0.076g)およびトリエチルアミン(0.077mL)の乾燥DMF(1ml)溶液に添加した。反応混合物を90分間攪拌し、次いで濃縮し、酢酸エチル(30ml)に再溶解し、そして飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(25ml)および水(5ml)で洗浄した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過しそして濃縮した。酢酸エチルを溶媒として用いる分取シリカtlc(1mm)によって精製し、化合物15(0.055g)を得た。これを以下の分光法により確認した。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{d}_6$ 

$\text{DMSO} + \text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ )  $\delta$  2.13 (s, 3H), 2.23 (s, 6H), 3.35 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 6.80 (s, 2H),  
6.93 (d, 2H), 7.23 (d, 2H).

実施例 2

## ハプテン結合体

RT3ハプテン (4-(カルボキシメチル)フェニル-(2,4,6-トリメチルフェニル)-メチルホスホネート (化合物7、図1)) を、ハプテン上の遊離カルボキシル基によってウシ血清アルブミン (BSA) およびキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) に結合させた。

5.4mgのRT3を37℃でリン酸緩衝液に溶解し、次いで6mgのEDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド-HCl)、およびN-ヒドロキシスルホスクシンイミド (S-NHS) と、それぞれ1:2:2のモル比で混合した。10mgのBSAを水に溶解し、そして次いでハプテンに添加した。ハプテンのBSAに対するモル比は、BSAの分子量を64,000として、100:1であった。混合物を室温で3時間攪拌し、次いで4℃で2日間にわたり、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) に対して2回、透析を行った。

RT3-KLH結合体を、KLHを添加する前にハプテン、EDC、S-NHS混合物のpHをNaOHを用いて6.0に調節したことを除き、RT3-BSAと同様の方法で調製した。ハプテンのタンパク質に対する比は、BSAの分子量を64,000として、100:1であった。反応混合物を2時間室温で攪拌し、次いで4℃で2日間にわたり、PBSに対して透析を行った。

透析後、タンパク質の濃度を、BSAをタンパク標準として用いるマイクロ-ビシンコニン酸 (micro-bicinchonic acid) アッセイによって測定した (Pierce、Rockford、Illinois)。

実施例 3

## 免疫化およびmRNA単離

BALB/c雌性マウス (14週齢) に、完全フロイントアジュバント中に乳化した50

$\mu\text{g}$ のRT3-KLHを腹腔内注射した。マウスを、4週目および7週目に不完全フロイントアジュバント中に乳化した $10\mu\text{g}$ のRT3-KLHで追加免疫した。マウスを最後の注射の3日後に屠殺し、そして脾臓を取り出してmRNAの供給源として使用した。2回目の注射後の免疫応答をELISAにより測定した。RT3-BSAに対する抗血清の力価は1:100,000であった。

mRNAの調製 - mRNAを、上記のようにRT3-KLHで免疫したマウスから得た105 mgの脾臓から単離した。mRNAを、FastTrack mRNA単離キット (Invitrogen Corp, San Diego, CA) を用いて、製造者の説明書に従って精製した。mRNAの収量は、以下の式を用いて分光光度的に測定したところ $5.4\mu\text{g}$ であった：

$$[\text{mRNA}] = (A_{260}) (0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}) D \quad \text{ここで } D \text{ は希釈係数である}$$

#### 実施例 4

ファージディスプレイライブラリーの構築のための材料および方法

以下の手順において使用されるプロトコルは、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)に記載された。

制限消化、アガロースゲルでの制限酵素消化産物の分析、フェノール/クロロホルムを用いるDNAの精製、 $2 \times \text{TY}$ 培地およびプレートの調製、テトラサイクリンおよびアンピシリンストック溶液の調製、タンパク質のPAGE、リン酸緩衝化生理食塩水の調製、アルカリ溶解によるプラスミドDNAの調製、プラスミドDNAの塩化セシウム精製。

すべての酵素は、New England Biolabs (Beverly, MA) により供給され、そして記載しない限り製造者の説明書に従って使用した。

連結はAmersham (Arlington Heights, IL) 連結キットを使用して行った。グラスミルク (Bio 101, La Jolla, CA) あるいはマジックミニプレップまたはマジックPCRプレップ (Promega, Madison, WI) を使用するDNAの精製は、製造者の条件に従って行った。

コンピテントセルの調製および形質転換は、Bio-Rad (Hercules, CA) エレクトロ形質転換プロトコルに記載の方法に従って行った。

以下は、McCaffertyら、1992、特許第W092/01047号に記載される：

ファージの調製、ファージミド粒子、一本鎖DNA、可溶性単鎖Fv抗体の発現、パンニングおよびELISAの手順、PCRおよびBstN1消化による多様性の分析。

DNAは、コンピテントなTG1細胞（遺伝子型：K12d(lac-pro), sup E, thi, hsd D5/F'traD36, pro A+B+, Lac Iq, lac ZdM15）またはHB2151細胞（遺伝子型：K12d(lac-pro), thi/F' pro A+B+, Lac IqZ dM15）中に形質転換した。

マウスPCRプライマー、ベクターpCANTAB 3およびpCANTAB 5、ならびに抗M13抗体は、Pharmacia (Piscataway, NJ) から入手可能である（それぞれカタログ番号27-9400-01、27-9401-01、27-9402-01）。

#### 実施例4.1

「固定化金属アフィニティークロマトグラフィー手順」（IMAC）を用いる可溶性単鎖Fv（scFv）抗体の迅速な/複数の単離を容易にするベクターの調製

触媒性抗体のスクリーニングにおいて、ファージミドベクターから細菌で発現された抗体を容易に精製/濃縮する手段を有することか有利である。以下の変化をファージミドベクターpHEN、pCANTABに組み込んだ（McCaffertyら、(1992)特許出願第W0 92/01047号、Hoogenboom H.R.ら、Nacl. AcidR es. 19, (1991):4133-4137、Pharmacia製品文献カタログ番号27-9401-01）：

i) 抗体のC末端に6つのヒスチジン残基をコードする配列を導入した。

ii) 抗体のC末端にmycタグペプチドをコードする配列を、SCFvの高感度の検出/別の精製のために含んだ。これらの変化を組み込むことにより、細菌で発現した抗体を濃縮および精製するための非常に簡便で迅速な手順を開発した。

2対のオリゴヌクレオチドを合成して以下に示す二本鎖挿入物を生成した。これらは、NotI部位に適合性の5'突出を有し、それゆえpHEN、pCANTAB中のこの部位にクローン化して、下記のように5'末端でNotI部位を再生し得る。



## His-6 1/2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |        |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
|     | ala | ala | his | his | his | his | his | his | amb |        |
| 5'G | GCC | GCA | CAT | CAT | CAT | CAC | CAT | CAC | TA  | 3'     |
| 3'  |     | CGT | GTA | GTA | GTA | GTG | GTA | GTG | ATC | CGG 5' |

## His-6 3/4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |        |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
|     | ala | ala | his | his | his | his | his | his | gly |        |
| 5'G | GCC | GCA | CAT | CAT | CAT | CAC | CAT | CAC | GG  | 3'     |
| 3'  |     | CGT | GTA | GTA | GTA | GTG | GTA | GTG | CCC | CGG 5' |

(amb= アンバー コドン)

His-6 3/4を、pHEN1のPst1/Not1部位にクローン化した、Clacksonら、Nature 352(1991):624-628に記載の高親和性オキサゾロン (oxazalon) 結合クローンからなるpHEN-OX16にクローン化した。この構築物は、9E10抗体9を用いて検出され得る[aOX抗体-his-6-mycタグ-アンバーコドン-遺伝子3]からなる産物を生じる(9E10抗体9を産生する細胞株はATCC, Rockville, MDから入手可能である。M YC1-9E10.2と称するCRL1729)。この新たな構築物をpOX16his-11と呼び、そして

図5に示す。

このクローンを用いて下記の「固定化金属アフィニティクロマトグラフィー手順」(IMAC)精製方式を実施した。さらなる構築物をHis-6 1/2をクローンscFv4に挿入することにより作製し、これはpCANTAB3にクローン化したリソソーム (lysozyme) 結合D1.3 scFv抗体からなる。この構築物は、抗D1.3抗血清を用いて検出され得る(D1.3抗体-his-6-アンバーコドン-遺伝子3)からなる産物を生じる。

すべてのクローニング操作をTG1において実施し、そして正確なクローンを単鎖Fvとしての発現のために非サプレッサー株HB2151に導入した。

すべての容量は開始培養容量の50 mlであり、そしてすべての細菌の増殖は宿主HB2151において30℃であった。目的のプラスミドを有するE. coli細胞を、2% グルコース、100 μg/mlのアンピシリンを補充した2×TY培地中で0.7~1.0 O.D./mlまで増殖させた。培養物を、50 ml Falconチューブ中で3500 rpmで10分間室温で遠心分離し、2×TY/100 μg/mlアンピシリン/1 mM IPTG中に再懸濁し、そして3時間増殖させた。培養物を、50 ml Falconチューブ中で3500 rpmで15分間4

℃の温度で遠心分離し、そして1 mlの冷緩衝液A (PBS/1 M NaCl/1mM EDTA) 中に再懸濁して氷上に15分間置く。サンプルを10分間2回遠心分離し、ペリプラズム含有物を有する上清を採集し、そしてMgCl<sub>2</sub>を1～2 mMに添加した。

400 μlの、緩衝液Aで予め平衡化しておいたNi-NTAアガロース：緩衝液1の1：1スラリー (Qiagen, Chatsworth, CA) をペリプラズム調製物に添加し、そして10分間反転プラットフォーム (inverting platform) 上で室温でインキュベートした。混合物をマイクロ遠心分離機で10～15秒間低速で遠心分離し、そしてペレットを1 mlの緩衝液Aに再懸濁した。このプロセスをさらに2回繰り返してから250 mMのイミダゾールを有する100 μlのPBSまたは緩衝液Aのいずれかに再懸濁した。10分後、上清を採集し、そしてペレットを別の100 μlの同じ緩衝液で再抽出してプールした。

結果を図6中に、大文字A、B、C、D、EおよびFで印を付したレーンにおいて示す。図6レーンAは、3時間の誘導後ペリプラズム中にscFvが豊富に蓄積することを示す。予想されたとおり、scFvは一晩のインキュベーション後の培養上清中にのみ見出された (データは示さず)。ペリプラズムからの抗体の単離は、

それがより短い誘導の後に、より良好な質の産物の潜在性を有して調製され得るのみならず、ペリプラズムから実施する場合、最初の遠心分離工程自体が抗体を効果的に濃縮するという有利性も有する。レーンBおよびCは、抗体フラグメントが、上記のようにNi-NTAマトリックスをペリプラズム抽出物とインキュベートし (レーンAを参照のこと)、そして結合したscFvを緩衝液A/250 mMイミダゾールで溶出した後に、効率的に結合および回収されることを示す。レーンDおよびEは、溶出をPBS/250 mMイミダゾール (NaClの添加なし) 中で実施し得ることを示す。これは抗体のその後の使用のためにより有用な緩衝液であり得る。レーンFは、クローンscFv4his-6が同じ方法で回収され得る抗体フラグメントを産生することを示す。

この手順は抗体を濃縮/精製する非常に簡便な手段であり、触媒作用についてのスクリーニングに必要な複数のサンプルの同時の調製を容易にする。

遺伝子IIIの中央のNot1クローニング部位からBamH1部位にわたるDNAを単離するために、上記の構築物のベクター形態をNot1およびBamH1での切断により調製した。これを用いてPCANTAB 3およびpCANTAB5内の等価なNot1/BamH1部位を置換して、ベクターPCANTAB 3 his-6およびpCANTAB5 his-6を得た。これはmycタグおよびhis-6タグを新たな骨格に移行させる（図7）。

#### 実施例4.2

RT3で免疫したマウス由来のファージライブラリーの調製

構築、PCRおよびマウス由来ファージディスプレイライブラリーの配列分析に使用したすべてのプライマーの配列を以下に示す：

##### VK1次プライマーの配列

VKA BACK 5' GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT CCA 3'  
 VKB BACK 5' GAT ATT GTG ATA ACC CAG GAT GAA 3'  
 VKC BACK 5' GAC ATT GTG CTA/G ACC CAG TCT CCA 3'  
 VKD BACK 5' GAC ATC CAG ATG ACN CAG TCT CCA 3'  
 VKE BACK 5' CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA 3'  
 VKF BACK 5' GAA AAT GTG CTC ACC CAG TCT CCA 3'

MJK1FONX 5' CCG TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC 3'  
 MJK2FONX 5' CCG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC 3'  
 MJK4FONX 5' CCG TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC 3'  
 MJK5FONX 5' CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC 3'

##### VH1次プライマーの配列

VH1FOR-2 5' TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC 3'  
 VH1BACK 5' AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G 3'

##### VKリンカープライマーの配列

VKALINKFOR  
 TGG AGT TTG GGT CAT CAA AAC ATC CGA TCC GCC ACC GCC AGA GCC  
 VKBLINKFOR  
 TTC ATC CTG GGT TAT CAC AAT ATC CGA TCC GCC ACC GCC AGA GCC  
 VKCLINKFOR  
 TGG AGA CTG GGT T/CAG CAC AAT GTC CGA TCC GCC ACC GCC AGA GCC  
 VKDLINKFOR  
 TGG AGA CTG XGT CAT CTG GAT GTC CGA TCC GCC ACC GCC AGA GCC  
 VKELINKFOR  
 TGG AGA CTG GGT GAG AAC AAT TTG CGA TCC GCC ACC GCC AGA GCC  
 VKFLINKFOR  
 TGG AGA CTG GGT GAG CAC ATT TTC CGA TCC GCC ACC GCC AGA GCC

##### VHリンカープライマーの配列

LINK BACK 5' GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA 3'

##### プルスループライマー (pull through primer)

HBKAPA10 5' CAT GAC CAC AGT GCA CAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG 3'  
 JK1NOT10 5' GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC 3'  
 JK2NOT10 5' GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC 3'  
 JK4NOT10 5' GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC 3'  
 JK5NOT10 5' GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC 3'

##### PCR スクリーニングプライマー

KSJ28 5' GTC ATT GTC GGC GCA ACT ATC GGT ATC 3'  
 FDTSEQ1 5' GTC GTC TTT CCA GAC GTT AGT 3'

脾臓 mRNA は、RT3-KLH で免疫したマウス（実施例 3 を参照のこと）由来のものを  
用い、そしてプライマーとしてランダムヘキサマー（Pharmacia, Piscataway  
， N.J. ）を用いて、cDNA を調製した。PCR 反応条件は、本質的に McCafferty ら、  
特許出願 W092/01047 に記載の通りであり、製造業者の条件に従って Taq ポリメ  
ラーゼを用いる。

1 次重鎖産物（VH）を、プライマー VH1FOR-2 および VH1BACK を用いて作製した。  
1 次軽鎖 PCR 産物（VL）を、等モル量の 4 つの MJKFONX プライマーと 5 つの VKBA  
CK プライマー（VKABACK、VKCBACK、VKDBACK、VKEBACK、VKFBACK）の 1 つとを用  
いて、5 つの個別の反応で作製した。VL に関する PCR 条件は、94℃ 1 分間、55℃  
1 分間、および 72℃ 2 分間の 25 サイクル、それに続く 10 分間の 72℃ でのインキュ  
ベーションであった。VH については、ハイブリダイゼーション温度として 55℃ で  
はなく 60℃ を用いた。これは、より良好な結果が得られるためである。

リンカーフラグメントを、テンプレート pscFvNQ11（McCafferty, J. ら、W092/  
01047）をプライマー LINKBACK とともに用いて、それぞれプライマー VKALINKFOR  
、VKCLINKFOR、VKDLINKFOR、VKELINKFOR、VKFLINKFOR の内の 1 つを含有する 5 つ  
の個別の反応で調製した。

1 次産物をゲル精製し、そして VH の 3' 末端および種々の VL の 5' 末端に相補的な  
リンカーフラグメントを用いて、5 つの個別の連結反応で互いに連結した。連結  
を、3 つのフラグメントを用いて、そしてプライマーを添加することなく「モッ  
ク (mock)」PCR 反応中で行った。連結を、約 10ng のそれぞれのフラグメントが存  
在する 25  $\mu$ l 容量中において 2 つ組で (in duplicate) 実施した。この連結は、9  
4℃ 1 分間、60℃ 2 分間、そして 72℃ 2 分間の 25 の温度サイクル、それに続く 10  
分間の 72℃ でのインキュベーションを通して行った。25  $\mu$ l のアセンブリ反応物  
をゲルに泳動し、そして脱染の後、アセンブルした産物を、ゲル上で適切に可視  
化した（データは示さず）。

クローニングのための材料を、クローニング部位を導入するプライマー（VH1B  
ACKAPA10 および JK1NOT10、JK2NOT10、JK4NOT10、JK5NOT10 の混合物）を用いて、  
2 次 PCR 反応において調製した。連結反応からの少量の産物をテンプレート（50  $\mu$

1のPCR反応中に1  $\mu$ l)として用いた。PCR条件は、94℃ 1分間、55℃ 1分間、および72℃ 2分間の25サイクル、それに続く10分間の72℃でのインキュベーションであった。

2次PCR産物を、酵素ApaL1/Not1で切断し、ゲル精製し、pCANTAB3his-6のApaL1およびNot1部位にクローン化し、そしてエレクトロコンピテントTG1細胞に形質転換した。(形質転換効率は、pUC19については $5 \times 10^8 / \mu$ gであり、連結したベ

クターについては $1 \times 10^6 \sim 10^7 / \mu$ gであった)。 $1.2 \times 10^6$ クロンのライブラリーを作製し、そして18/20のクロンが挿入物を有することを見出した。PCRによる分析およびBstN1消化は、これらが全て異なることを示す。

#### 実施例4.3

RT3-BSAに対するマウス抗RT3ライブラリーのパンニング

パンニング手順は、本質的にMarks, J.D.ら、Biotechnology 10(1992): 779-783に記載の通りであった。RT3ハプテン(化合物7、図1)を、実施例2に記載のようにBSAに結合させた。Nunc(Kamstrup, Denmark)免疫吸着チューブを、1mlの20mg/mlのRT3-BSAでコートした。チューブを、2時間37℃にて4ml PBS/2%ミルクパウダーで上部までブロックし、0.8~1.0mlの濃縮ファージ(10~50mlの培養上清に等価)を結合に用いた。チューブを反転させなかった。ファージの結合および洗浄を、MOPS緩衝化生理食塩水(MBS、これは50mM MOPS pH 7.4、150mM NaClである)を用いて行った。

洗浄を、MBS/0.1% Tween 20で10回、そしてMBSで10回行った。結合したファージを、800mlの100mMトリエチルアミンを用いて溶出し、400mlの1M Tris pH7.4で中和し、そして指數的に増殖するTG1-tr細胞(Tファージ耐性TG1細胞)に感染させた。溶出液で感染させた細胞を、2%グルコース/100mg/mlアンピシリンを補充した大きな(22×22cm)TYプレートにプレートした。細菌のストックを次の日に調製し、それらから液体培養物に播種し、M13ヘルパーファージでレスキューし、そしてパンニング手順を、濃縮ファージを用いて2回目を繰り返した。

パンニングプロセスを繰り返し、濃縮ファージをポリクロナルELISAに用いた。パンニングしていないライブラリーからは、シグナルは得られなかったが、

連続的なパンニングを通して増加したシグナルが得られた（示さず）。PAN1、PAN2、およびPAN3後に溶出したファージの数は、予測されるようにそれぞれの倍数で増加した（それぞれ、0.12、50、および $2200 \times 10^6$ の感染ファージ）。

PAN1およびPAN2からの溶出ファージを、HB2151細胞（可溶性SCFvを産生する非サプレッサー株）に導入した。個々のコロニーを、2%グルコースを補充した100mg/mlアンピシリンを有するTY培地（TY/G/A）を含有する96ウェルプレートに取り出し、4～16時間育成した（ストックプレート）。これらの培養物を用いて、TY/Aおよび0.1%グルコースを含有する第2の96ウェルプレートに播種した。このプレートを、30℃にて2～4時間インキュベートした後に、IPTGを1mMまで添加することにより誘導し、そして一晩増殖させた。翌日、培養上清を、予め2mg/mlのRT3-BSAでコートし、そして2%ミルクパウダーでブロックしたELISAプレートに添加した。結合を1×MBS/2%ミルクパウダー中で実施し、そして結合を、マウス9E10抗体を用い、それに続いてヤギ抗マウスペルオキシダーゼ（Sigma, St. Louis, Missouri）を用いて検出した。mycタグペプチドを検出するために用いた9E10抗体は、ATCC、Rockville, Maryland（CRL1729、与えられた名称は、MYC1-9E10.2である）から入手可能である。

この手順を通して抗原としてRT3-BSAを用い、そしてMBS緩衝液を用いるPAN1からの結合に関するスクリーニングにより、364のクローンから47の陽性を同定した。同様の方法で、115/184の陽性を、PAN2から同定した。クローンの多様性を、実施例4.0に記載のようにそれぞれのクローンからPCR増幅した一本鎖DNA挿入物のBstNI消化により分析した。

結果を、以下に示すように1グループずつ表1に要約する。PAN1からの分析した48の内の17のバインダー（35%）は、パターンAを有した。PAN2からの115の内合計78の結合クローン（68%）が、PCRパターンAを有した。（これらの内の22を再ストリークし、そしてさらに分析した。これらを図1および表1に示す）。パターンBは、PAN1からの48の内の2クローン（4.1%）、およびPAN2からの115の内の24（21%）に見出された。PAN1からの48の内の2は、パターンCを有し（4.1%）、一方PAN2からの115の内の3（2.6%）は、このパターンを有した。パター

ンDは、PAN1からの48クローンの内の3（6.2%）、およびPAN2からの115の内の3（2.6%）において見出された。従って、それぞれのグループからの陽性の比率は、PAN1からPAN2で変化するようである。選択が、単にRT3への結合の強度に基づく場合、これは、いくつかのラウンドのパンニングの後に潜在的に触媒作用的なクローンの損失を生じ得る。

表1. PCRパターンに従うマウスRT3バインダーのグループ化

| PCR パターン                   | サンプル番号                                                                                                                             |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A                          | PAN1-3,4,6,8,9,14,17,18,24,25,27,30,35,36,45,46,47.<br>PAN2-60,62,63,64,65,66,67,70,72,74,77,78,79,84,85,86,<br>87,88,91,92,96,97. |
| B                          | PAN1-12,20.<br>PAN2-49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,69,82,90,93,94,<br>99,100,101,102,103,104,105,106.                            |
| C                          | PAN1-5,48<br>PAN2-75,76,80.                                                                                                        |
| D                          | PAN1-10,26,43.<br>PAN2-68,83,89.                                                                                                   |
| a                          | PAN1-2,13.                                                                                                                         |
| e                          | PAN1-11,19.                                                                                                                        |
| q                          | PAN1-7,15.                                                                                                                         |
| i (小さな挿入物)                 | PAN1-23,38,44.                                                                                                                     |
| j (小さな挿入物)                 | PAN1-31,40,42.                                                                                                                     |
| E                          | PAN2-71,73                                                                                                                         |
| PAN1 からの<br>10の独特な<br>パターン | b-21, d-41, f-1, g-33, h-16, k-28, l-39, n-34, p-32, G-22.                                                                         |
| PAN2 からの<br>47の独特な<br>パターン | F-61, H-81, I-95, J-98.                                                                                                            |

少なくとも15の他のパターン（多くが1度のみ現れる）が、PAN1において見出された。PAN1に存在する多くの他のパターンは、PAN2において同定されなかった

。さらに、PAN1において同定されなかったいくつかのパターンが、PAN2に現れた。これは、ライブラリー中に、本発明者らが同定したPCRパターングループにより示されるよりもかなり多くの多様性が存在することを主張する。

#### 実施例4.4

マウスRT3ファージ抗体ライブラリーから選択されたクローンの結合分析

PAN2から単離したいくつかのマウスRT3ファージ抗体クローン（表1、実施例4.3を参照のこと）を、結合特異性に関してさらに特徴付けた。競合阻害様式を用いて分析を行った。この分析において、以下に詳細に記載されるように、RT3-BSAコートしたウェルに添加する前に、抗体を遊離ハプテンまたは産物あるいはハプテンおよび産物の一部と最初に反応させる。

分析のために選択されたクローンおよびそれらの相当するPCRパターン（表1、実施例4.3を参照のこと）は、50（PCR B）、64（PCR A）、68（PCR D）、71（PCR E）、80（PCR C）、84（PCR A）、95（PCR I）、96（PCR A）、および97（PCR A）であった。結合した抗体を50mM EDTA、0.5M NaClで溶出した以外は、実施例4.1に記載のIMACプロトコルを用いて、各々のクローンの50ml培養物から可溶性scFvを精製した。各々のクローンに対するscFv濃度を、適切なscFv濃度スタンダードを含有するゲル上で溶出したタンパク質の一部を泳動することにより、銀染色SDSポリアクリルアミドゲルから見積った。scFvタンパク質を4  $\mu$ g/mlにまで希釈し、次いでRT3-BSAコートしたELISAプレートの11ウェルにわたって1:2に系列希釈した。最大ELISAシグナルの50%を与えるscFvの濃度を、滴定から測定した。このscFvの濃度を、以下に記載の引き続く競合阻害アッセイに用いた。

競合阻害ELISAアッセイを、各々100  $\mu$ Mの以下の化合物とともにscFv（上記の滴定によって決定した濃度で）をインキュベートすることにより実施した：RT3ハプテン（化合物7、図1）、RT3ハプテンの左側部分（RT3Aと呼ばれる、化合物8、図2）、RT3ハプテンの右側部分（RT3Bと呼ばれる、化合物12、図3）、基質（化合物15、図4）のエステル分解切断（esteriolytic cleavage）からの予測される産物の左側および右側部分（Product A（メシチル酢酸（Mesitylacetic acid）、図4）およびProduct B（化合物13、図4）と呼ばれる）。scFvを、RT



3-BSAコートELISAウェルに添加する前に、室温にて1時間チューブ中でインヒビター化合物とともにプレインキュベートした。アッセイの結果を図8に示す。OD<sub>415nm</sub>での読み取り値を、1の値（これは、添加した競合インヒビターの非存在下で相当するscFvに対して見られるELISAシグナルを表す）に規格化した。この結

果は、68および71の例外を除く全てのクローンが、RT3-BSAへのそれらの結合において遊離RT3ハプテンにより阻害されることを示す。遊離RT3による阻害を示さなかったクローンは、BSAとの交差反応性を有することが示された。クローン64、84、96、97、および50はまた、RT3Aによる結合阻害を示し、そしてProduct Aによりもっと小さな程度の結合阻害を示す。RT3BまたはProduct Bで試験したクローンのいずれについても阻害は見られない。

#### 実施例4.5

マウス抗RT3 scFv（単数または複数）の配列決定

PAN1およびPAN2由来のクローンの大部分は、PCR Aパターングループに分類されるが、このグループのクローンが、同一であるか、または異なるかは明確でなかった。そこで、これらのクローンの多くを配列決定した。さらに、同一の重鎖および軽鎖が、他の主要なパターングループ内で用いられているかを決定する試みにおいて、他の主要なグループからのいくつかの代表的なクローンを配列決定した。

一本鎖DNAを、表1に示されるこれらのクローンから調製し、配列決定を、Sequenaseキット（USB, Cleveland OH）を用いて実施した。Genbank生殖系列配列に対する配列アライメント、およびクローン間での配列アライメントを、「MacVector™」（IBI, New Haven, Connecticut）プログラムを用いて実施した。5'および3'末端の配列は、PCRプライマーによりコードおよび強調されているので、これらをアライメントのために「除去」した。軽鎖配列の提示において、プライマーコード配列は示していないが、用いたプライマーを右側のカラムに示す。重鎖について、5'プライマーは、単一であるが、縮重プライマーであるので、このプライマーにより導入される配列を、各々の場合において示す。比較のために、実

際の重鎖プライマー配列を、各々のクローンの5'および3'末端で示す。1つのクローンの配列を、最上列に示し、そして他のクローンについてこの配列との差異を示す。全てのPCR A変異が示す(アミノ酸を生じる)変化を、配列決定ゲルにおいて再検討した。パターンAの重鎖について、全ての独自の変化を、配列決定ゲルにおいて再検討し、そして多数のクローンにおいて生じる変化を、この変化

を保有する少なくとも1つのクローンにおいて検討した。

#### マウスRT3バインダーの軽鎖配列

図9に示すように、8つの異なる軽鎖は、パターンAからの15の異なるクローンに用いられている。クローンmR6およびmR8に関連する鎖は、1つのサイレントなヌクレオチド変化により、生殖系列V遺伝子と異なる。mR9、mR18およびmR27に用いられる鎖は、別の1つのサイレント変異により、mR6およびmR8と異なる。従って、これらの5つのクローンは、生殖系列と同一のタンパク質配列を共有する。クローンmR9およびmR27は、異なるプライマーを使用して同一の配列を派生している。これは、それらがこの同一配列の独立した単離物であることを示す。

クローンmR3およびmR25は、増幅されているが、また互いに異なるプライマーを使用している配列において同一である。mR3およびmR25が共有する配列は、2つのサイレントなヌクレオチド変化および、FR3およびCDR3において2つのアミノ酸変化を生じる2つの変化により、mR6およびmR8と異なる。ほとんどの変化は、クローン14、30、36、84、および96により共有される軽鎖中に生じる。これらおよびこのグループのすべての他の軽鎖において、ほとんどのアミノ酸変化は、FR3、CDR3、およびFR4に集まる。

mR6/8またはmR9/25で示される基礎的な生殖系列クローンが予想され得る。これらは、CDR2におけるSからNへの変化、および次いで3つの異なる様式における変化により、4、97、および14(+他の4つ)により示されるクローンを生じる。同様に、同一の開始点からCDR3におけるYからFへの変化が存在し得、これにより、mR3およびmR25が生じる。変化の第3系列は、mR24を生じ得る。

パターンC(クローンmR80)に関連する軽鎖もまた、パターンAクローンで用いられる生殖系列配列とともに整列させて図9に示す。パターンCの軽鎖は、パタ

ーンAにおいて用いられているものと同一の生殖系列に由来する、より高度に変異した形態であるようである。

他のPCRパターンを示すクローンは、異なる生殖系列由来の配列を使用するようである。最も近親な生殖系列に対するこれらの他のクローンの関係を図10に示す。パターンB(50、69)において、生殖系列からの2つのヌクレオチド変化は、

1つのアミノ酸変化を生じる。パターンD(10、43、および68、および83)において、生殖系列からの8つのヌクレオチド変化は、5つのアミノ酸変化を生じる。パターンI(95)において、生殖系列からの2つのヌクレオチド変化は、1つのアミノ酸変化を生じる。

図11は、パターンA(mR6、mR8に関する)の軽鎖配列に対する異なる軽鎖配列の関係を示す。これらの間には多くの差異が存在する。パターンDおよびIに関して、タンパク質配列のみを示す。なぜなら、ヌクレオチド配列は、多くの差異を有するからである。後者の2つのグループは、他のものよりも長いCDR2を有する。

#### マウスRT3バインダーの重鎖配列

PCRパターンAに関連する重鎖配列の分析は、軽鎖に関するのと同様に、それらが全て密接に関係しているが、ほとんどの場合において互いに異なることを示す(図12)。生殖系列に対するアライメントは、これらのサンプルにおいて幾分明確ではない。単離されたクローンにおいて、最も近親な生殖系列は、サブグループVII-IIに属するが、この生殖系列とは多数の差異が存在する。さらに、クローン間でより多くのアミノ酸変化が存在するようである。予測したように、変化は、CDR中に集まっている。

パターンBの重鎖(図13)を、異なる生殖系列に対して整列させて、そして再びこれからの多数の変化を示す。このグループにおける4つ全てクローンは、同一のようである。従って、パターンBから配列決定されたクローンは、同一の抗体の複数の単離物であるようである。パターンDにより示されるクローンは、全て互いに同一であり、そしてCDR3の配列を除いて、4つのアミノ酸が最も近親

な生殖系列と異なる(図13)。

パターンBの重鎖と全ての異なる重鎖パターンとのアライメントを図14に示す。パターンC(80)およびパターンI(95)の重鎖は、パターンBの重鎖と密接に関係する。パターンCは、4つのアミノ酸が異なる。パターンIは、1つのサイレントな変異および1つのアミノ酸変化により異なる。興味深いことに、パターンB、C、およびIに関連する重鎖は、わずか3アミノ酸のCDRを有する。

mR95におけるアミノ酸変化は、アンバーコドンを導入するようである。これは、

サプレッサー株TG1が、ファージの調製に用いられる場合、この位置にアミノ酸を導入するが、可溶性抗体のスクリーニングに用いられる非サプレッサー株HB2151においては、終止コドンとして作用することが予測される。

パターンAにおけるクローンの多様性

表2は、PCRパターンA中のクローンを配列決定したことから得られた情報を照合する。このグループにおける各々の異なる軽鎖配列を、ラベルai~aviiiで示す。このグループにおける各々の異なる重鎖配列を、ラベルAi~Axで示す。

表2. マウスRT3バインダーの鎖利用-PCRパターンA  
軽鎖

| 重鎖    | ai  | aII | aiii | aiv | av | avi | avii | aviii              |
|-------|-----|-----|------|-----|----|-----|------|--------------------|
| Ai    |     |     |      |     |    |     |      | 14,30,36,<br>84,96 |
| Aii   |     |     | 3    |     |    |     |      |                    |
| Aiii  |     |     |      |     |    | 4   |      |                    |
| Aiv   |     |     |      |     | 24 |     |      |                    |
| Av    |     | 9   |      |     |    |     |      |                    |
| Avi   | 6,8 |     |      |     |    |     |      |                    |
| Avii  |     |     |      | 64  |    |     |      |                    |
| Aviii |     |     |      |     |    |     | 97   |                    |
| Aix   |     | 27  |      |     |    |     |      |                    |
| Ax    |     |     | 25   |     |    |     |      |                    |

クローン14、30、36 (PAN1)、84、96 (PAN2) は、同一であり、そしておそらく同一の最初のクローンの複製した単離物を表す。クローン6および8はまた、互いに同一である。他の場合は、全てのクローンは異なる。同一の軽鎖が、2つの

異なる重鎖とともに用いられた2つの場合が存在する (mR9/mR27のaIIおよびmR3およびmR25のaiii)。上述したように、各々のペアリングにおける軽鎖は、異なるプライマーを用いた。複製した単離物は別として、同一の重鎖が異なるクローンに用いられる場合は、ここでは存在しない。

これらのPCRおよび配列決定実験は、マウスライブラリーにおいて、PCR分析により判断される全体規模、および配列決定により判断されるより微小 (subtle level) レベルの両方において、かなりの多様性が実際存在することを示唆する。

#### 実施例5.1

触媒活性に関する scFv 分子のスクリーニング

##### 1. 第1の選択

初期のスクリーニングプロトコルを用いて、ハプテン親和性に基づいて選択した多数のscFvフラグメントから潜在的に触媒性のscFv分子のサブセットを迅速に選択した。

a) 固定化：ELISAアッセイにおいてハプテンに結合したscFvフラグメントを、触媒活性を検出するスクリーニングについて選択した。96ウェルMillititer GV 汎用プレート（Millipore）を、0.05% Tween-20を含有するPBSで予め湿らせ、そして洗浄した。抗myc抗体Protein Aアガロースに固定化したscFvフラグメントの懸濁液（前記参照、さらに実施例6.1も参照のこと）を、96ウェルフィルタープレート中の個々のウェルにそれぞれ移した。残渣の上清を、フィルタープレートを通しての吸引により除去した。固定化scFvフラグメントを、PBS/Tween（ $5 \times 200 \mu\text{L}$ ）、PBS（ $3 \times 200 \mu\text{L}$ ）、および25mM HEPES（pH 7.0）、140mM NaCl、0.01%  $\text{NaN}_3$ （ $3 \times 200 \mu\text{L}$ ）による4℃での汎用によりウェル中で洗浄した。

b) scFvおよび基質のインキュベーション：固定化し洗浄した抗体に、25mM HEPES（pH 7.0）、140mM NaCl、0.01%  $\text{NaN}_3$ 中の約50  $\mu\text{M}$ の基質（1）の200  $\mu\text{L}$ を添加した。引き続き約24時間室温（約22℃）でのインキュベーションの後、基質溶液（ビーズではない）を取り除き、そして高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析するまで凍結（-20℃）した。同一の96ウェルプレート（依然として固定化scFvを含有する）を、10mM Tris, pH 9.0、140mM NaCl、0.01%  $\text{NaN}_3$ にて、4

$\times 200 \mu\text{L}$ /ウェルで洗浄した。再び、200  $\mu\text{L}$ の（今回は上記のpH 9.0緩衝液中の）35～50  $\mu\text{M}$ のRT3基質（化合物15、図4）を添加した。scFvフラグメントを、3時間化合物1とともにインキュベートし、そしてpH 7.0の場合と同様に、基質溶液を除去し、後の産物形成の分析のために凍結した。

c) 産物形成に関する反応混合物の分析：サンプル数を減少させるために、概して2または3つの反応混合物（50  $\mu\text{L}$ の各々の反応混合物）のプールを、HPLC分析にかけた。混合物（100または150  $\mu\text{L}$ ）を、Eppendorf遠心分離器において遠心分離し、HPLCシステムへのアガロースの持ち越しを防止した。次いでサンプルを、Vydac C-18分析用逆相カラムを備えたWaters HPLCシステムに注入した。溶

出液の成分を、30分にわたる、0.1% TFA水溶液から0.1% TFAアセトニトリル溶液への直線勾配を用いて分離した。産物を、Watersスペクトル検出システムを用いて（代表的には、215または270nmに設定して）、分光光度的に検出および定量した。

46個のハプテン結合scFvフラグメントの初期のスクリーニング分析を、pH 7.0および9.0で実施し、触媒活性を検出した。HPLC分析を実施し、そして産物の予測される保持時間にピークを与えるサンプルプールについてピーク面積を測定した。結果を、下の表3に要約する。反応混合物（2または3のプールとして）のHPLC分析は、pH 7.0において、3つのサンプルからなる1つのプールおよび2つのサンプルからなる1つのプールが、実質的な産物形成を有するようであることを示した。pH 9.0において、多数のプールが、バックグラウンドより上の産物ピーク面積を示した。3つのサンプルからなる3つのプールが、0.6よりも大きなピーク面積を有する大きな産物ピークを示し、これらは陽性として得点付けられた。従って、初期のスクリーニング分析は、潜在的に触媒性のscFvフラグメントの数を、pH 7.0において46から5に、そしてpH 9.0において46から9に限定した。pH 7.0における3つの候補は、pH 9.0における3つの候補物と同一のscFvフラグメントであった。

表 3

pH 7.0およびpH 9.0における  
初期のスクリーニングフェージ抗体プールのHPLCアッセイ結果

ph 7.0

| サンプル     | ピーク面積 |
|----------|-------|
| ブランク     | .18   |
| 1,2,3    | -     |
| 4,5,6    | -     |
| 8,11,12  | -     |
| 14,16,17 | -     |
| 18,19,20 | 0.52  |
| 21,24,25 | -     |
| 27,28,29 | -     |
| 30,31,32 | -     |
| 33,34,35 | -     |
| 36,37,38 | -     |
| 39,40,41 | -     |
| 42,44,45 | 0.455 |
| 46,47,48 | 0.476 |
| 50,65,76 | 0.559 |
| 83,97    | 0.571 |



## ph 9.0

| サンプル     | ピーク面積 |
|----------|-------|
| ブランク     | -     |
| 1,2,3    | 0.572 |
| 4,5,6    | -     |
| 8,11,12  | 0.674 |
| 14,16,17 | 0.581 |
| 18,19,20 | 0.79  |
| 21,24,25 | 0.522 |
| 27,28,29 | 0.504 |
| 30,31,32 | 0.627 |
| 33,34,35 | 0.496 |
| 36,37,38 | 0.492 |
| 39,40,41 | 0.492 |
| 42,44,45 | 0.470 |
| 46,47,48 | 0.471 |
| 50,65,76 | 0.511 |
| 83,97    | 0.407 |

上記の同定された各々の活性プール由来の個々のクローンを、触媒活性について再アッセイした。scFvは、抗Mycアガロースに結合したままであるので、プール

アッセイに用いた同一の材料を、個々のクローンのアッセイに再使用した。触媒性アッセイの結果を以下の表4に示す。触媒性アッセイは、6つのクローンを同定した：11、12、18、19、30、および83。これらは、HPLCにおいて産物ピークを生じた。クローン83は、pH 7.0において活性であったが、pH 9.0において活性ではなかった。クローン18およびクローン19は、pH 7.0および9.0の両方において

活性であった。クローン11、12、および30は、pH 9.0においてのみ活性であった。

表4

pH 7.0および9.0における個々のファージ抗体クローンのHPLCアッセイ結果

pH 7.0

| サンプル   | ピーク面積 |
|--------|-------|
| 18, 19 | 0.556 |
| 83     | 2.04  |
| 97     | -     |

pH 9.0

| サンプル | ピーク面積 |
|------|-------|
| 8    | -     |
| 11   | 1.5   |
| 12   | 1.21  |
| 18   | 1.09  |
| 19   | -     |
| 30   | 0.96  |
| 31   | -     |
| 32   | -     |

## 実施例5.2

### 1. 触媒活性の2次スクリーニング

scFvフラグメントを触媒活性についてさらに調べるために、上記の初期スクリーニングで同定された潜在的に触媒性のタンパク質を個々に増殖させ、そして精製した。scFvの精製は、IMACまたは抗Myc-プロテインAアガロースでのアフィニティークロマトグラフィーのいずれかを使用して実施例6.1に記載のように達成

された。アッセイは、初期スクリーニングと同じ緩衝液システムおよびpH値で行われたが、しかし抗体は個々に試験され、そして抗体は固定化されず溶液中に遊離していた。

これらの2次アッセイから、18および83と称する2つのscFv分子の触媒活性が見出された。クローン18は、pH9.0で活性であるがpH7.0で不活性であるようであり、一方クローン83は、pH7.0で活性であるがpH9.0または5.0で不活性であるようである。両方の活性は、10  $\mu$ Mの抗体を40  $\mu$ Mの基質および30  $\mu$ Mのハプテンと

共にアッセイした場合、ハプテン(2)により有意に阻害された。これらの2つのクローンを以下に記載のようにscFvの大量精製のための候補として選択した。これらのアッセイの結果を実施例6.4に示す。

#### 実施例6.1

触媒性mRT3ファージ抗体クローン18およびクローン83由来のscFvの大量精製

ペリプラズム溶解物の調製－可溶性抗RT3 scFvを発現するE.coli HB2151クローンを、2%グルコースおよび100  $\mu$ g/mlアンピシリンを含む2  $\times$  YTにおいて一晚増殖させた。一晚培養物を使用して0.1の出発OD600で500mlの2  $\times$  YTに接種し、そして培養物を1.2～1.8のOD600まで28℃にて3～5時間振盪した。IPTGを1 mMの最終濃度で添加し、そして振盪インキュベーションを25℃にて2.5時間続けた。細胞を4000  $\times$  Gで10分間ペレット化し、そしてペレットを6 mlのペリプラズム溶解緩衝液(10mMリン酸緩衝液、1 M NaCl、1 mM EDTA、pH7.5)に再懸濁した。氷上にて30分間インキュベーションした後、溶解物を6,000  $\times$  Gで遠心分離して細胞の破片を除去した。PMSFを清澄な溶解物に最終濃度5  $\mu$ g/mlで添加し、そして溶解物を以下に記載のように精製するまで氷上で保存した。

固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)

MgCl<sub>2</sub>をペリプラズム溶解物に1 mMの最終濃度で添加し、そして溶解物を10mMリン酸緩衝液、1 M NaClで洗浄し、そして平衡化した1 mlのベッド容量のNi<sup>2+</sup>荷電セファロースカラム(Probond Metal binding Resin, Invitrogen Corp., San Diego, CA.)に通した。カラムを10ベッド容量の10mMリン酸緩衝液、1 M NaCl、pH 7.5で洗浄し、そして結合したscFvを50mM EDTA、0.5M NaClで溶出させた。カラ

ム溶出物を濃縮し、そして7 mMリン酸緩衝液、0.15M NaCl、pH8.0においてCentricon 10マイクロコンセンレーター(Amicon, Beverly, MA)を製造者の説明書に従って使用して透析した(Mol.Cell.Biol. 5(1985):3610-3616を参照のこと)。scFvのいくつかの調製物については、IMAC溶出物の濃縮は必要でなかった。

抗mycペプチドアフィニティー精製-scFvのC末端の13アミノ酸のペプチドタグを認識するモノクローナル抗体9E10を、Affinica Antibody Orientation Kit (Schleicher and Schull, Keene, NH)を製造者の説明書に従って使用してプロテインAアガロースに架橋結合させた。1 mlのベッド容量のカラムを0.23Mグリシン、0.3M NaCl、pH2.5で予め洗浄し、そして10mMリン酸緩衝液、0.5M NaCl、pH7.5で再び平衡化した。ペリプラズム溶解物を等量の10mMリン酸緩衝液、pH7.5で希釈し、次いでカラムを通過させた。カラムを10ベッド容量の10mMリン酸緩衝液、0.5M NaClで洗浄し、そして結合したscFvを0.23Mグリシン、pH2.5、0.3M NaClで溶出させた。いくつかの調製物については、カラム溶出物を透析し、そして上記のようにCentricon 10マイクロコンセンレーターを使用して濃縮した。

#### 実施例6.2

疎水性相互作用クロマトグラフィーによるファージ抗体触媒性クローン18およびクローン83由来のScFvフラグメントの精製

E.coliクローン18および83の溶解物に由来するscFvのIMACまたは抗mycペプチドプロテインAアガロース精製(実施例6.1を参照のこと)の後、scFvのさらなる精製をFPLCシステム(Pharmacia)に接続したアルキルsuperose 5/5カラムで達成した。

クロマトグラフィーを、0.1M リン酸ナトリウム(pH7.0)中の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の直線逆勾配を使用して行った。これは2つの緩衝液から形成されている：

緩衝液A：0.1M リン酸ナトリウム(pH7.0)中の2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

緩衝液B：0.1M リン酸ナトリウム(pH7.0)

勾配条件は以下のようであった：

0～3 ml：10% 緩衝液B

3～39 ml：直線勾配、10%～70% 緩衝液B

39～42ml：直線勾配、70%～100%緩衝液B

42～44ml：100%緩衝液B

44～46ml：直線勾配、100%～10%緩衝液B

46～49ml：10%緩衝液B

サンプルを0.783容量の0.1Mリン酸ナトリウム中の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 飽和溶液(4.1M( $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )の添加により1.8M( $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の最終濃度に調整し、そして適切な容量の10%緩衝液B：90%緩衝液Aで希釈し、カラムに注入するために適切な値に容量を増大させた。画分を採集し、そしてScFvに対応するピークをSDS-PAGEにより上記のように同定した。これらをプールし、濃縮し、そして適切に結合活性または触媒活性のアッセイに使用した。カラムからのタンパク質の溶出を、 $\text{OD}_{280}$ によりモニターし、そして自動的にプロットした。クローン18由来のIMAC精製scFvの代表的なクロマトグラムは、2つの異なるピークに溶出するタンパク質の大部分を示す。それぞれのピークに対応する画分を示したようにプールした。ピーク1は、17.25～21.90%の緩衝液Bで溶出する広いショルダー（プール1）とそれに続く24.2%緩衝液Bでの鋭いピーク（プール2）からなる。ピーク2は、48.10%緩衝液Bで溶出する鋭いピーク（プール3）である。scFvの精製を、銀染色SDS/PAGEによりモニターして、以下の結果を有する。HICカラム(IMAC精製scFv+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )へのロード物質は、90%より多くのタンパク質がscFvであることを示した。少なくとも4つの別のバンドも可視であった。HICの後に得られたプール1およびプール2の分析により、ロードされたscFvの大部分がこれらのプールに同等に分布しており、そしてscFvの実質的な精製が達成されなかったことを示した。プール3は、少量のscFvおよびさらなる低分子量のバンドを含んでいた。

クローン83についてのクロマトグラムは、scFvタンパク質の大部分が54.7%緩衝液Bでの単一の鋭いピークにおいて溶出することを示す。タンパク質の第2の小さなピークは、100%緩衝液Bでの最終洗浄の間に溶出する。これらのピークに対応する画分をプールし、そしてSDS/PAGEとその後の銀染色により分析した。HIC(IMAC精製物質+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )のカラムロード物質は、90%より多くのscFvを含んでいた。HIC後、scFvの大部分を、54.7%緩衝液Bで溶出する単一の主なピー

クにおいて回収した。クローン18については、scFvの実質的な精製はHICによっては達成されなかった。少量のscFvが後に溶出する小さなピークにおいて見出された。

### 実施例6.3

ファージ抗体触媒性クローン18およびクローン83に由来するIMACおよびHIC精製ScFvの結合アッセイ

上記の精製プロトコルに由来する画分または画分のプールを（実施例6.1または6.2）、本質的に実施例4.4に記載のようにRT3-BSA固相ELISAアッセイを使用して、RT3結合活性について分析した。画分または画分のプールをまず第1にPBS/Tween-20中で1：5または1：10に希釈し、次いでRT3-BSAでコートしたELISAプレートの11個のウェルにわたってPBS/Tween-20中で1：2に連続希釈した。50%最大のELISAシグナルを与える力価を、分析した各サンプルについて測定した。分析したプールまたは画分の容量をこの力価に掛けることにより、各サンプルにおける結合単位の数 の推定値を決定し得る。この分析は、クローン83について、HICカラムにロードしたscFvの大部分が回収されたが、これはカラムロードと比較して10%未満の結合活性を有したことを示した。この結果は、HICがscFvの精製に不適切であり得ることを示唆する。なぜなら、結合活性およびおそらくは触媒活性の損失をもたらすscFvタンパク質の不安定性をもたらし得るからである。

### 実施例6.4

ファージ抗体クローン18およびクローン83に由来するIMACおよびHIC精製scFvの触媒性アッセイ

クローン18については、代表的な触媒性アッセイを以下のように設定した：50  $\mu$ lのscFvを、145  $\mu$ lのRT3基質（化合物15、図4）および5  $\mu$ lの水またはいくつかのアッセイでは5  $\mu$ lのRT3ハプテンに添加した。50  $\mu$ lの水および147  $\mu$ lのRT3基質からなるブランクを、RT3基質のバックグラウンド加水分解をモニターするために設定した。反応を6時間進行させ、その後サンプルを-20℃で凍結させて反応を停止させた。サンプルを実施例5.1に記載のようにHPLCにより分析した。アッセイに添加したscFvの量は代表的に1～5  $\mu$ gの範囲であり、そしてタンパ

ク質を10mM Hepes、150mM NaCl、pH7.3において緩衝化した。代表的なRT3基質濃度は、25mM Tris-HCl(pH9.0)、140mM NaCl、および0.01% NaN<sub>3</sub>において緩衝化して50μMであった。

IMAC精製18scFvについての代表的な陽性の触媒性アッセイの結果を示すHPLCプロフィールを図15Aに示す。図15Bは、同じアッセイであるがRT3ハプテン（化合物5、図1）の存在下で行ったHPLCプロフィールを示す。最後に、図15Cは、ブランク（scFvを加えない）のHPLCプロフィールを示す。

同様の様式で、18 scFvのHIC精製（実施例6.2を参照のこと）後に得られた画分プールのアッセイも行った。主要なscFv含有プール（上記の実施例6.2に記載のプール2）のアッセイの代表的な結果を図16に示す。同様の結果がプール1およびプール3のアッセイから得られた（データは示さず）。

クローン83に由来するIMACまたはHIC精製scFvのアッセイを以下を除いてクローン18について記載したのと同様の様式で行った。基質を25mM HEPES(pH7.0)、140mM NaClおよび0.01% NaN<sub>3</sub>において緩衝化した。中性のpHでのRT3基質のより低いバックグラウンド加水分解のために、反応は代表的に24時間行った。IMAC精製83 scFvについての陽性の触媒性アッセイの結果のHPLCプロフィールを図17Aに示す。RT3ハプテンの存在下で繰り返した同じアッセイを図17Bに示す。ブランクもまた分析し、そして図17Bにおけるプロフィールと同様のプロフィールが得られた（データは示さず）。HIC後（実施例6.2を参照のこと）に得られた主なscFvを含有するプールの触媒性アッセイを図18に示す。

期待された産物ピークならびに産物に関連しないピークの保持時間がHPLCのランの度に変化したことに留意されたい。この変化の理由は未知である。RT3産物（化合物13、図4）単独のHPLCでの試験ランおよび215nmでのモニターにより、異なるピークプロフィールが生成されたことが示された。この215nmのプロフィールを内部コントロールとして使用して、各HPLCランの270nmプロフィールでの産物ピークの位置を正確に決定した。

上記のように行った触媒アッセイの結果からの結論は、以下のとおりである。クローン18および83の両方に由来するIMAC精製scFvはRT3基質を加水分解し得、

そして適切な保持時間でHPLCカラムから溶出する産物ピークを生成する。RT3ハプテンの存在下では、触媒作用は、おそらくRT3基質と比較して抗体ポケット中でのRT3のより強い結合により、完全に排除される。これは、scFvが触媒作用を担うというさらなる証拠である。なぜなら、高い親和性でRT3基質またはハプテ

ンの特異的に認識し、そして結合し得る天然のエステラーゼが存在しなさそうであるからである。

クローン18または83のいずれかについてのscFvのHIC精製後、scFv含有画分において触媒活性が観察されなかった。活性の損失は、おそらく折り畳まれていないことまたは凝集をもたらすscFvの不安定性により得る。クローン83についてのscFvの不安定性は、実施例6.3に記載のHIC精製scFvで行われたアッセイにおける結合の損失により明らかに示された。

#### 実施例7.1

未処置のヒトライブラリーからの遷移状態アナログRT3に対するバインダーの単離

免疫化スキームが迂回され得、そして低親和性および中程度親和性のヒト抗体（ $K_{ds}$ 86nMまで）が非免疫化供給源に由来するヒト抗体ライブラリーから直接単離され得ることが示された(Marksら, J.Mol.Biol. 222(1991): 581-597)。このアプローチは、以下の実施例に記載された多くのアプローチにより改良され得る（単数または複数の）出発クローンを提供し得る（関連した実施例についてはMarksら, Bio Technology 10(1992): 779-783を参照のこと）。従って、これらのアプローチは、特に治療的触媒性抗体の領域において極めて価値があると証明され得る完全なヒト触媒性抗体の単離を導き得る。

Marksら, J.Mol.Biol. 222(1991): 581-597に記載された非免疫化ヒトライブラリーを、100~200 $\mu$ g/mlのRT3-BSAのコート濃度が使用されたことを除いて免疫化マウスライブラリーについて記載されたようにチューブにコートしたRT3-BSAについてパンニングした。精製スキームの進行は、ポリクローナルなファージを使用してELISAによりモニターした。RT3-BSAに対する2回のパンニングに由来するポリクローナルなファージ(RT3BSA:2)は基質と共に一晚インキュベーション



した後に可視シグナルを生じる。RT3-BSAに対する3回のパンニングに由来するポリクローナルなファージ(RT3BSA:3)はELISAで強いシグナルを生じる(5分間に1 O.D.)。BSAに対する結合は全く観察されず、そしてRT3-BSAへの結合は10~100  $\mu$ g/mlの可溶性非結合RT3と予めインキュベーションすることにより阻害され

た、このことは、これがRT3に特異的であることを示唆する(示さず)。

3回および4回のパンニングに由来する個々のクローンを、実施例4.3に記載の方法を使用して結合について試験した。大規模にスクリーニングを始める前に、最少のELISAコート濃度を決定した。抗原濃度を100  $\mu$ g/mlから1.6  $\mu$ g/ml(100  $\mu$ l/ウェル)に減少させると、シグナルの減少は30%しか招かなかったので(データは示さず)、従って2  $\mu$ g/ml濃度を全ての以降のELISAスクリーニングに使用した。

3回のパンニングに由来する144クローンを、IPTGで誘導したHB2151クローンに由来する培養上清100  $\mu$ lを使用してRT3-BSAに対する特異的結合についてELISAアッセイにより試験した。図19Aに示すように、40クローンは強いELISAシグナル(基質との一晚インキュベーション後0.7~2.5 O.D.)を与え、そして27クローンは中程度のシグナル(基質との一晚インキュベーション後0.2~0.5 O.D.)を与えた。図19Bは、RT3-BSAに対する4回のパンニングに由来する48クローンについての結果を示す。この39クローンからは強いELISAシグナル(0.7~2.5 O.D.)が示され、1クローンは中程度のELISAシグナル(0.34 O.D.)を示した。

PCR分析およびBst NI消化により、両方の回のパンニングに由来する試験した良好なバインダーは全て、共通のPCRパターンを共有し、そして1つを除いて全てのより弱いバインダーは、より高いバインダーのPCRパターンとは異なる共通のPCRパターンを共有したことが明らかになった。1つのさらに別のパターンが弱いバインダーの1つに関して見出された。Clacksonら, *Nature* 352(1991): 624-628により以前に記載されたように、中程度のシグナルについての濃縮と比較して高いELISAシグナルに関するクローンの連続的な回のパンニングでの濃縮を見ることは興味深い。

## 実施例7.2

### ヒトRT3バインダーの配列分析

以下に示す各PCRパターン群の種々のメンバーについて配列決定を行った：

PCR1=RT3:1、4、5、41、63、80

PCR2=RT3:47、54

PCR3=RT3:61

各群のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を図20に示す。

### 実施例8.1

#### ヒトRT3バインダーの鎖シャッフリング

鎖シャッフリングに使用されるスキームを図21に示す。ヒトライブラリーまたはマウスライブラリーにおけるscFvクローンは全て、重鎖上流のプラスミド配列、重鎖と軽鎖との間のリンカー配列、および軽鎖下流の遺伝子3配列を含む特定の共通配列を共有する。プライマーをこれらの領域から選択／合成してクローン化された重鎖または軽鎖のV領域を増幅する一般的手段を提供した。従って、プライマーLMB3およびPCRHLINKを使用するPCRは重鎖産物を生じるが、しかしプライマーFDTSEQ1およびLINKPCRLは軽鎖産物を生じる。LINKPCRLおよびPCRHLINKは相補的であり、それゆえ産物を連結する手段を提供する。この方法により、各クローンに由来する別々の重鎖または軽鎖を、最初のライブラリーに由来する相補鎖の集団全体に連結し得る。連結した産物は、プライマーLMB3およびFDTSEQ1を使用する第2次のPCRのテンプレートとして作用し、そして第2次の産物を、クローニングのためにSfiIおよびNotIで消化する。プライマーを、各消化工程後に観察されるべきフラグメントのサイズの変化を可能にするように選択した。さらに、消化の効率は、比較的大きな突出している制限部位の上流を有することによりおそらく改良される。

#### 鎖シャッフリングの方法

以下のプライマーを使用する：

FDTSEQ1 5'GTC GTC TTT CCA GAC GTT AGT 3'  
 LMB3 5'CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'  
 PCRHLINK 5'ACC GCC AGA GCC ACC TCC GCC 3'  
 LINKPCRL 5'GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT 3'

。

1 次重鎖および軽鎖PCR産物を以下の反応により調製する：

| 重鎖                |             | 軽鎖                |             |
|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
| LMB3プライマー         | 2.5 $\mu$ l | FDTSEQ1プライマー      | 2.5 $\mu$ l |
| (10pmoles/ml)     |             | (10pmoles/ml)     |             |
| PCRHLINKプライマー     | 2.5 $\mu$ l | LINKPCRLプライマー     | 2.5 $\mu$ l |
| (10pmoles/ml)     |             | (10pmoles/ml)     |             |
| 10×PCR反応緩衝液       | 5.0 $\mu$ l | 10×PCR反応緩衝液       | 5.0 $\mu$ l |
| 5 mM各dNTP         | 2.5 $\mu$ l | 5 mM各dNTP         | 2.5 $\mu$ l |
| Taqポリメラーゼ(5 U/ml) | 0.3 $\mu$ l | Taqポリメラーゼ(5 U/ml) | 0.3 $\mu$ l |
| 水                 | 37 $\mu$ l  | 水                 | 37 $\mu$ l  |

PCRの条件は、94℃ 1 分間、60℃ 1 分間、72℃ 2 分間を25サイクルと最後に72℃で10分間である。単離されたクローンについては、テンプレートは細菌コロニー由来の爪楊枝接種物として最も簡便に提供され得る。ライブラリー材料については、DNAを凍結細菌ストックから調製し、そして2～10ngを反応液に添加した。1 次PCR産物をアガロースゲルで精製し、そして5  $\mu$ lのGeneclean「グラスミルク」(Bio 101, La Jolla, CA)を用いて精製し、それぞれ10  $\mu$ lの水中の2つの溶出物を得た。

アセンブリーは、以下のように行う：

|           |                       |
|-----------|-----------------------|
| 精製 H      | 2.5 $\mu$ l (20～50ng) |
| 精製 L      | 2.5 $\mu$ l (20～50ng) |
| 10×反応緩衝液  | 2 $\mu$ l             |
| 5 mM各dNTP | 1.0 $\mu$ l           |
| Taqポリメラーゼ | 0.2 $\mu$ l           |
| 水         | 37 $\mu$ l            |

PCRの条件は、94℃ 1 分間、65℃ 4 分間を25サイクルと最後に72℃で10分間で

ある。

2次PCRについては、1  $\mu$ lの連結した物質をテンプレートとして使用した。反応は、以下のように設定した：

|                           |             |
|---------------------------|-------------|
| 連結したPCR産物                 | 1 $\mu$ l   |
| LMB3プライマー(10pmoles/ml)    | 2.5 $\mu$ l |
| FDTSEQ1プライマー(10pmoles/ml) | 2.5 $\mu$ l |
| 10×PCR反応緩衝液               | 5.0 $\mu$ l |
| 5 mM各dNTP                 | 2.5 $\mu$ l |
| Taqポリメラーゼ(5 U/ml)         | 0.3 $\mu$ l |
| 水                         | 37 $\mu$ l  |

PCRの条件は、94℃ 1 分間、60℃ 1 分間、72℃ 2 分間を25サイクルと最後に72℃で10分間である（5  $\mu$ lがゲルで容易に見られ得る）。

2次産物をフェノール：クロロホルムで抽出し、そしてエタノールで沈澱させてTaqポリメラーゼを除去した。PCR産物を、製造者の説明書に従って50℃にてSfiIで一晩消化した。翌日、37℃にてNotIで3時間消化する前に、1/10容量の1 M NaClを添加して最終濃度を150mM NaClとし、Triton-X100を添加して最終濃度を0.01%とした。消化物をフェノール：クロロホルムで処理し、沈澱させ、H<sub>2</sub>Oに溶解し、そして1.5%アガロースで泳動することにより精製し、そして「GeneClean」(Bio 101, La Jolla, CA)で精製した。DNAを最終容量10～15  $\mu$ lで溶出し、そしてpCANTAB5 his-6のSfiI/NotI部位にクローン化した。

pCANTAB5 his-6のプラスミドDNAをアルカリ溶解法により調製し、そして塩化セシウム遠心分離により精製した。精製DNAを、100  $\mu$ g/mlのDNA濃度でSfiIで製造者の説明書に従って消化し(SfiIについては50℃にて一晩)、次いでNotIで3時間消化した。消化産物を直接Chromaspin 1000カラム(Clontech, Palo Alto, CA)にロードしてスタッファーフラグメントを除去し、そして卓上型遠心機にて2200 rpmで3分間スピンした。次いでDNAをフェノール：クロロホルム抽出し、そして使用するために100  $\mu$ g/mlで溶解した。

ライゲーションをAmersham(Arlington Heights, IL)ライゲーションキットを

使用して以下のように行う：

|                                            |                     |
|--------------------------------------------|---------------------|
| ベクターDNA                                    | 1 $\mu$ l (100ng)   |
| 挿入DNA                                      | 2 $\mu$ l (10～50ng) |
| 10mM MgCl <sub>2</sub> 、200mM Tris (pH7.4) | 3 $\mu$ l           |
| 緩衝液 A                                      | 24 $\mu$ l          |
| 緩衝液 B                                      | 6 $\mu$ l           |

16℃にて30～60分インキュベートする。ライブラリーの調製のために、上に示す5倍の容量を使用した。ライゲーション産物を濃縮し、Genecleanを使用して精製し、そして10～15  $\mu$ lの容量の水に溶出した。これを、エレクトロコンピテントなTファージ耐性TG1細胞にBio-Rad (Hercules, CA)エレクトロポレーターを製造者の説明書に従って使用して導入した。

未処置ヒトライブラリー（実施例5.1を参照のこと）の4回のパンニング後に単離された3つのクローンhRT3-1、hRT3-47、およびhRT3-61を、上記の鎖シャッフリングプロトコルのテンプレートとして使用した。実施例5.2に記載のように、配列分析により、3クローンはそれぞれVHおよびVL遺伝子利用に関して互いに独特であることが示された。6つの異なるライブラリーを調製した。それぞれの場合、ライブラリーの名前は、固定された鎖およびそれが由来するクローン番号をいう。従って、H47は、ヒト軽鎖のライブラリーと結合したRT3:47由来の固定された重鎖を有するライブラリーである。

得られたライブラリーのサイズは以下のとおりである：

表3

| ライブラリー | サイズ ( $\times 10^6$ ) | 挿入の比率 |
|--------|-----------------------|-------|
| H 1    | 7.8                   | 9/10  |
| H47    | 6.2                   | 8/10  |
| H61    | 6.8                   | 9/10  |
| L 1    | 9.6                   | 9/10  |
| L47    | 9.8                   | 9/10  |
| L61    | 8.4                   | 8/10  |

プライマーFDTSEQ1およびLMB3を使用するPCRを各ライブラリーに由来する10のコロニーについて行い、挿入の比率を決定した。結果を上表に示す。さらに、PCR産物をBstNIで消化して多様性を決定した。しかし、鎖シャッフルしたライブラリーにおける(所定のクローンの)約2/3の配列が現在固定されており、そして同じV遺伝子ファミリーの異なるメンバーが同じ「BstNI特徴」を与え得ることを思い出すべきである。これにも関わらず、ライブラリーメンバーはいずれももとのクローンに関連するパターンを有していなかった。いくつかの場合では、同じライブラリー内にパターンが重複して見出され、そして1つのパターンはH1ライブラリーにおいて3回見出され得た。

#### 実施例8.2

##### ヒト鎖シャッフリングライブラリーのパンニング

ファージ粒子を、Marksら、Biotechnology 10(1992): 779-783に記載されたようにライブラリーからレスキューした。同じ出発クローンに由来するライブラリー対からのファージをプールし、そしてRT3-BSAに対してパンニングした(例えば、H1およびL1)。パンニングおよびレスキューを、Nunc(Kamstrup, Denmark)免疫吸着チューブを1mlのRT-BSA(20 $\mu$ g/ml)で一晩コートしたことを除いて、本質的にMarksら、J.Mol.Biol. 222(1991): 581-597に記載のように行った。コーティングおよびブロッキングを以前のようにリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中で行った。等量の20mlのファージを、最終容量800 $\mu$ lの2%脱脂粉乳を有するMO

PS緩衝化生理食塩水(MBS)中で使用した。洗浄、溶出、感染、およびM13ヘルパーファージでのレスキューは上記のとおりである。

非パンニングライブラリー(PAN0)、1回目のパンニング(PAN1)、またはパンニング2回(PAN2)のいずれかに由来する「ポリクローナルな」ファージをELISAに使用して各ライブラリー対のパンニングプロセスの進行を決定した。

図18に示すように、PAN0サンプルからシグナルは観察されなかった。低レベルのシグナルがRT3:1およびRT3:47に由来するPAN1サンプルにおいて観察され、そしてPAN2サンプルにおいて著しい改善が見られる。RT3:61に由来するライブラリーにおいては、ELISAシグナルは2回のパンニング後でさえ比較的低い。ELISAの

結果は、表4に示すように各回のパンニング由来の溶出液を定量する場合に反映される。増加する数のファージが2回目のパンニングから溶出される。H61/L61ライブラリーでのPAN1およびPAN2で得られるファージ数は、H1/L1およびH47/L47ライブラリー由来の対応する収量よりも少ない。

表4

パンニング由来のファージ収量 ( $\times 10^6$ )

|          | シャッフルした<br>RT3:1 | シャッフルした<br>RT3:47 | シャッフルした<br>RT3:61 |
|----------|------------------|-------------------|-------------------|
| PAN1の溶出液 | 1.4              | 2.9               | 0.34              |
| PAN2の溶出液 | 1300             | 1600              | 200               |

インプットしたファージは約  $2 \sim 10 \times 10^{12}$

表5は、再シャッフルしたヒトバインダーのパンニング由来の陽性物の比率を示す。再シャッフルしたRT3:1およびRT3:47については、パンニング1回の後ですら大部分が陽性であるとスコアされた。再シャッフルしたRT3:61由来のポリクローナルなファージはPAN1の後で陰性であり、そしてPAN2の後で陽性であったため、個々のコロニーはこのライブラリー由来のPAN2からしか分析されなかった。

表5 再シャッフルしたヒトライブラリー由来の陽性物の比率

| 集団           | 陽性の比率 | 再ストリークした数 |
|--------------|-------|-----------|
| RT3:1再シャッフル  |       |           |
| PAN1         | 39/44 | 28        |
| PAN2         | 42/44 | 15        |
| RT3:47再シャッフル |       |           |
| PAN1         | 29/44 | 25        |
| PAN2         | 35/58 | 28        |
| RT3:61再シャッフル |       | 37        |
| PAN2         | 44/96 |           |

陽性クローンを再ストリークし、そしてRT3およびBSA結合について再試験した。全ての再シャッフルしたヒトライブラリーは、パンニングの1～2回後に高い

比率のバインダーを生じた。これらは、(FTDSEQ1およびLMB3を使用する)PCR/Bst NI消化により、以下の表6に示すように、RT3:1再シャッフルライブラリーについては9 PCRパターンに、RT3:47再シャッフルライブラリーについては4 PCRパターンに、そしてRT3:61再シャッフルライブラリーについては8 PCRパターンにグループ分けされた。

軽鎖のライブラリーとシャッフルされた重鎖が、互いに関連しており、従ってPCRパターンの多様性の可能性が減少した、異なる軽鎖を引き出すことの強い可能性がある。逆に、所定のPCRグループ分けの中でさえ、ある程度の多様性が配列決定により見出されることがありそうである。

表6. PCRに従ったヒトRT3バインダーのグループ分け

A. HU RT3:1から生じる再シャッフルクローン

| PCR パターン | サンプル番号                                                                       |
|----------|------------------------------------------------------------------------------|
| A        | PAN1-1, 5, 6, 9, [10], 12, 21, 27.<br>PAN2-31, 34, 35, 36, [38], 41, 42, 43. |
| B        | PAN1-2, 3, 4, 8, 11, 13, 22, 24 [25].<br>PAN2-30, 39.                        |
| C        | PAN1-[7], 14, [15], [19], 23.<br>PAN2-29, 33.                                |
| D        | PAN1-17, [18], [26].<br>PAN2-[44].                                           |
| E        | PAN2-32, 40.                                                                 |
| F        | PAN1-[20].                                                                   |
| G        | PAN1-28.                                                                     |
| H        | PAN1-16.                                                                     |
| I        | PAN1-37.                                                                     |

3/ RT3:1由来の全てのサンプルは、非常に低いレベルの他に、BSA結合について陰性であった。



## B. HU RT3:47から生じる再シャッフルクローン

| PCR パターン   | サンプル番号                                                                                                                                         |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A          | PAN1-2, 4, 12, 17, 20, 21, 22.<br>PAN2-4, 5, 6, 7, 27, 28, 29, 31, 33, 40, 41, 42, 44, 48,<br>49, 51, 52, 53.                                  |
| B          | PAN1-9, 10.                                                                                                                                    |
| C          | PAN1-1.<br>PAN2-37.                                                                                                                            |
| D          | PAN1-3, [26].                                                                                                                                  |
| パターン<br>未知 | 再スクリーニングにおいて陰性<br>PAN1-13, 14, 15, 16, 18, 19, 23, 24, 25.<br>PAN2-30, 32, 34, 35, 36, 38, 39, 43, 45, 46, 47, 50.<br>BSA に対するバインダー<br>PAN1-11 |

## C. HU RT3:61から生じる再シャッフルクローン

| PCR パターン   | サンプル番号                                                                                               |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A          | PAN2-2, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 32, 34, 35.                   |
| B          | PAN2-16, 30, 33.                                                                                     |
| C          | PAN2-4.                                                                                              |
| D          | PAN2-6.                                                                                              |
| E          | PAN2-12.                                                                                             |
| F          | PAN2-9.                                                                                              |
| G          | PAN2-22.                                                                                             |
| H          | PAN2-31.                                                                                             |
| パターン<br>未知 | 再スクリーニングにおいて陽性<br>PAN2-1, 3, 5, 27, 36, 37.<br>再スクリーニングにおいて陽性<br>PAN2-7.<br>BSAに対するバインダー<br>PAN2-19. |

## 脚注：

- 1/ サンプルは全てhu（もとのクローン番号）：再シャッフルされたクローン番号で表示し、例えば、hu47:12ヒトクローンは、第一のパンニングからの鎖シャッフリングクローンRT3:47および番号づけ誘導体12に由来した。ここでは表記するために、クローン番号のみを与える。
- 2/ 異なる出発クローンに由来するパターングループについての同じ文字の使用は、それらが同じであることを意味することを意図しない。
- 3/ 角括弧内のサンプルは、第1回では陽性であると評価されたが、再ストリーク後に拾ったクローンは陽性にはならなかった。このことは、異なる調製物由来で変化し得る発現を有する混合されたコロニーに、または初めの擬陽性に起因する。配列決定をhuRT3:47に由来する多くのクローンに対して行い、そしてこれらはB節において確認される。

どの抗体鎖がもとのヒトクローンに由来するかを決定する目的で、重鎖および

軽鎖のV遺伝子の別々のPCRを個々のクローンについて行った（鎖間のフレキシブルリンカーペプチドをコードする配列中に位置するプライマー（PCRHLINKおよびLINKPCRL）と共にFDTSEQ1またはLMB3のいずれかを用いた）。各PCRグループ

由来のクローン対を分析した（表6中の下線）。この結果は、hu61:16およびhu61:33の例外を有して（パターンB）、全ての重鎖がもとの単離物と同じ重鎖を有したことを示す。これらの2つのクローンは、今やRT3:47と同様な重鎖パターンおよび親クローンRT3:61と同様であり得る軽鎖パターンを有する。同じPCRパターンを有すると記載された再シャッフルされたクローンは（3%ゲルで泳動した全体のSCFvのPCR/消化から）、今や微小な相違を示す（4%ゲルで泳動した個々の軽鎖のPCR/消化から）。従って、hu1:11およびhu1:22間（パターンB）、hu1:17およびhu1:26間（パターンD）、hu1:32およびhu1:40間（パターンE）に相違が見出された。RT3:47に由来するクローンについて、hu47:9およびhu47:10（パターンB）、hu47:37およびhu47:1（パターンC）の軽鎖間の相違が見出された。RT3:61に由来するクローンについて、hu61:13およびhu61:24の軽鎖間（パターンA）に相違が見出された。それゆえ、この分析はこれらのクローン間のより大きな多様性を示す。

RT3:47のシャッフリングことに由来するクローンに対して配列決定を行った（表5で確認）。重鎖の分析は、hu47:7を除いて配列がもとの重鎖と同一であることを示す。（分析したクローンは、hu47:1、2、3、5、6、8、9、10、12、20、および22であった）。hu47:7において、CDR2中のバリンはTからCへの変化によりアラニンに変換された。軽鎖の配列決定を表5において下線で示したクローンに対して行った。

#### 実施例9.0

特異的溶出／競合結合を使用する方向づけされた選択

結合に対する競合（例えば、反応産物を用いる）を使用するパンニングまたは特異的溶出（例えば、より小さいホスホネートを用いる）を、パンニングプロセスを制御するために使用し得る。このような手順をELISAウェルにおいて行う場合、より高度の可変性が発揮され得る。従って、特定の手順の後溶出物を採集し

得、そしてプレート全体を検出手順にかける。結果に基づいて、特定のウェル由来の溶出物を、さらなる分析／パンニングについて選択し得る。

100mMトリエチルアミンを使用して96ウェルプレートからの溶出物を試験する

ための実験において、溶出後の一晚のELISAシグナルが0.289から0.019になったことを見出した。(シャッフルされたヒトRT3:47ライブラリーの1回のパンニングに由来する(47PAN1ファージ)  $2.5 \times 10^{11}$  個のポリクローナルなファージ/ウェルを使用した)。溶出物の力価測定は、 $7.5 \times 10^7$  個の感染性ファージ(すなわち、インプットの0.03%)が採集されたことを示した。これは、Nunc免疫吸着チューブからの溶出物と良好に比較される。この場合、同じサンプルについて  $1.6 \times 10^9$  個の感染性ファージが  $1 \times 10^{13}$  個のインプットから生じた(すなわち0.016%) (表3を参照のこと)。このタイプのアプローチにより、特定の溶出手順の範囲を比較し得、そして最も適切なサンプルをさらなる研究のためにE.coliに感染させた。

RT3分子の左側および右側に等価な最少の遷移状態のアナログをRT3a(化合物8、図2)およびRT3b(化合物12、図3)という。基質切断の左側の産物および右側の産物を産物A(メシチル酢酸、図4)および産物B(化合物13、図4)という。もとのマウスライブラリーのパンニング/溶出のために必要な種々の成分の最適濃度を決定するために、希釈系列をRT3、RT3a、RT3bおよび両方の反応産物(産物Aおよび産物B)について調製した。これらを、マウスRT3ライブラリーの1回目のパンニングに由来する  $100 \mu\text{l}$  の  $10 \times$  ポリクローナルなファージとプレインキュベートした(トリエチルアミン溶出を使用した)。

この分析の結果を図23Aおよび図23Bに示す。最も効果的な阻害は、RT3自体を用いて生じる。この選択されたファージ集団の結合が、右側の部分(図23B)によってよりも左側のTSAおよび産物(図23A)によりかなり大きな程度まで阻害されることが明らかである。実際、右側のTSAおよび産物を用いて試験される濃度でなんらかの阻害が生じるかどうかは全く明らかではない。さらに左側の産物よりも左側のTSAによるより大きな阻害が存在するようである。

もとの非パンニングマウスライブラリーを使用して特異的溶出を試みた。これは、 $150 \mu\text{l}$  の  $2 \mu\text{g/ml}$  のRT3-BSAでコートし、そして  $200 \mu\text{l}$  の2%Marvelでブロッ

クしたELISAウェルへの、 $200 \mu\text{l}$  の  $10 \times$  ファージ濃縮物の結合により行った。ファージを1時間結合させ、以下を  $200 \mu\text{l}$  添加することにより溶出した：

0.05  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M または 5  $\mu$ M RT3

5  $\mu$ M, 50  $\mu$ M または 500  $\mu$ M RT3a

5  $\mu$ M, 50  $\mu$ M または 500  $\mu$ M RT3b

100 mM トリエチルアミン

2 回の 15 分間の溶出に由来するファージをプールし、そして TG1 細胞または HB2 151 細胞に再導入した。図 24A は、それぞれの条件の設定下で生じたファージの収量をプロットする。トリエチルアミンは、2 ml の培養上清に等価なインプットから約  $10^4$  個のファージを与える。これは、以前の報告において記載される好結果のパンニングと一致し、これは以前に記載されたマウスクローンの全てを生じている。この実験において、約  $10^5$  個のファージが 20 ml の培養上清に等価であるインプットに由来した。RT3 および RT3a での溶出は、トリエチルアミンよりも多数のファージを生じる。RT3b は、「緩衝液単独」のコントロールにおいて達成される溶出のレベルに等価な、またはそれよりも多くの溶出レベルを与える。

この実験を反復したが、高いコート濃度 (100  $\mu$ g/ml) の RT3-BSA を使用し、そして容量をインプットファージの容量を上回るコート容量およびブロック容量を確実にするように (ウェルの側面への非特異的なファージの接着に関連するあらゆるバックグラウンド問題を防止するため) 調整した。この実験 (図 24B) において、全てのサンプルにおける溶出されたファージの総収量は、以前よりも減少した。

ポリクローナルなファージおよび可溶性抗体を種々の集団から調製し、そして ELISA において試験した。陽性シグナルを可溶性およびファージ ELISA を用いて、500  $\mu$ M の RT3a を用いた溶出により由来するサンプルから達成した。この集団由来の個々のコロニーをスクリーニングし、そして 22/144 のクローンが陽性であることを見出した。

もとの免疫吸着チューブ (Nunc) においてまた、パンニングを行った。溶出を

100 mM トリメチルアミンまたは 500  $\mu$ M RT3a のいずれかを用いて行った。結合を産物 A の存在下 (50、500、5000  $\mu$ M) または非存在下で行った。結果を以下にまとめる：

| 溶出法                | 競合産物の濃度          | 収量 ( $\times 10^6$ ) |
|--------------------|------------------|----------------------|
| 1/100 mM トリエチルアミン  | 0 $\mu$ M 産物a    | 52                   |
| 2/500 $\mu$ M RT3a | 0 $\mu$ M 産物a    | 42                   |
| 3/500 $\mu$ M RT3a | 50 $\mu$ M 産物a   | 0.59                 |
| 4/500 $\mu$ M RT3a | 500 $\mu$ M 産物a  | 0.85                 |
| 5/500 $\mu$ M RT3a | 5000 $\mu$ M 産物a | 47                   |

この実験において、トリエチルアミンおよびRT3a溶出によるファージの収量（42～52 $\times 10^6$ 個）は、以前の実験よりも高い。50  $\mu$ Mの産物Aが結合の間に存在する場合、RT3a溶出に由来するファージの収量は70倍減少する（このことは、結合が特異的であることを示している）。500  $\mu$ Mの産物Aを用いて同様の減少が存在するが、5000  $\mu$ Mの産物Aを使用する場合、収量は47 $\times 10^6$ 個に戻る。（このことは産物を溶解するために使用したDMSの効果であり得、DMSはこの特定のサンプル中に7.2%で存在した）。従って、最少のTSA分子でハプテン溶出を使用して96ウェルかまたは免疫吸着チューブのいずれかからファージを溶出することが可能である。さらに、結合プロフィールは反応産物と競合することにより変化され得、それによって、所望の要求に従って溶出された集団の結合プロフィールを調製し得る。

#### 実施例10

##### ヒトRT3バインダーのCDRシャッフリング

CDRフラグメントをシャッフルするために使用するスキームは、実施例8.1に記載される鎖シャッフリングスキームの改変である。

プライマーVHCDR3BACKおよびREV VHCDR3BACKは、互いにそしてCDR3のすぐ上流のヒトVH遺伝子のフレームワーク領域における保存配列に相補的である。Marks

ら(1991)により記載されるライブラリー由来の重鎖のCDR1およびCDR2の両方を含むDNAフラグメントの集団を、REV VHCDR3BACK（配列については下記を参照のこと）およびLBM3（実施例4.2に記載）を用いて増幅し得、そして選択されたクローンからのscFVの残りをVHCDR3BACK（配列については下記を参照のこと）およびFDTSEQ1（実施例4.2に記載）を用いて増幅し得る。このことは、2つのフラグメ

ントのアセンブリ反応により単一クローンの残存部分とCDR1およびCDR2の集団との結合を可能にする。

同様に、重鎖のCDR3領域を含むDNAフラグメントのライブラリーを、VHCDR3BACKおよびリンカーに位置するプライマーPCRHLINK（実施例4.2を参照のこと）を用いて増幅し得る。選択したクローン由来の重鎖の残存部分を、REV VHCDR3BACKおよびLMB3を用いて増幅し、そして軽鎖をLINKPCRL（実施例4.2を参照のこと）およびFDTSEQ1を用いて増幅した。このように、CDR3フラグメントの集団を2つの連続した2つのフラグメントのアセンブリ反応（第一は、CDR3の集団とのクローンに由来するCDR1およびCDR2のアセンブリを包含する）により単一のクローンに導入し得る。この後に、このフラグメントのフランキングプライマーであるLMB3およびPCRHLINKを用いて二次PCR反応を行う。この産物を、クローン由来の軽鎖とのこれの次のアセンブリのためにゲル精製した。

両方のCDRシャッフリング方法のために、scFVフランキングプライマーであるLMB3およびFDTSEQ1を用いる最後のPCR反応を行う。次いでCDRシャッフルされた物質を、pCANTAB5-his6にクローニングするために、NotIおよびSfiIで消化する（図7を参照のこと）。

#### CDRシャッフリングのための方法

プライマーFDTSEQ1、LMB3、PCRHLINKおよびLINKPCRLは、実施例4.2に記載されている。さらに、以下のプライマーを使用する：

VHCDR3BACK 5' GAC ACG GC(TC) GT(AG) TAT TAC TGT 3'

REV VHCDR3BACK 5' ACA GTA ATA (CT)AG (GA)GC CGT GTC 3'

（括弧内のヌクレオチドは、普遍的な増幅を確実にするために設計されたプライマー中の「変動」を示す。）

一次PCR産物を以下の反応において調製する。

#### CD1および2フラグメント

LMB3プライマー

(10 pmoles/ $\mu$ l)

2.5  $\mu$ l

REV VHCDR3BACKプライマー

|                     |               |
|---------------------|---------------|
| (10pmoles/ $\mu$ l) | 2.5 $\mu$ l   |
| 10 $\times$ PCR     |               |
| 反応緩衝液               | 5.0 $\mu$ l   |
| 5mM各dNTP            | 2.5 $\mu$ l   |
| Taqポリメラーゼ           |               |
| (5U/ $\mu$ l)       | 0.3 $\mu$ l   |
| 水                   | 50 $\mu$ lにする |

CDR3フラグメント

|                     |               |
|---------------------|---------------|
| PCRHLINKプライマー       |               |
| (10pmoles/ $\mu$ l) | 2.5 $\mu$ l   |
| VHCDR3BACKプライマー     |               |
| (10pmoles/ $\mu$ l) | 2.5 $\mu$ l   |
| 10 $\times$ PCR     |               |
| 反応緩衝液               | 5.0 $\mu$ l   |
| 5mM各dNTP            | 2.5 $\mu$ l   |
| Taqポリメラーゼ           |               |
| (5U/ $\mu$ l)       | 0.3 $\mu$ l   |
| 水                   | 50 $\mu$ lにする |

VHCDR3-リンカー-VLフラグメント

|                     |             |
|---------------------|-------------|
| FDTSEQ1プライマー        |             |
| (10pmoles/ $\mu$ l) | 2.5 $\mu$ l |
| VHCDR3BACKプライマー     |             |
| (10pmoles/ $\mu$ l) | 2.5 $\mu$ l |
| 10 $\times$ PCR     |             |
| 反応緩衝液               | 5.0 $\mu$ l |
| 5mM各dNTP            | 2.5 $\mu$ l |
| Taqポリメラーゼ           |             |
| (5U/ $\mu$ l)       | 0.3 $\mu$ l |



|                      |               |
|----------------------|---------------|
| 水                    | 50 $\mu$ lにする |
| <u>リンカー-VLフラグメント</u> |               |
| FDTSEQ1プライマー         |               |
| (10 pmoles/ $\mu$ l) | 2.5 $\mu$ l   |
| LINKPCRLプライマー        |               |
| (10 pmoles/ $\mu$ l) | 2.5 $\mu$ l   |
| 10 $\times$ PCR      |               |
| 反応緩衝液                | 5.0 $\mu$ l   |
| 5mM各 dNTP            | 2.5 $\mu$ l   |
| Taqポリメラーゼ            |               |
| (5U/ $\mu$ l)        | 0.3 $\mu$ l   |
| 水                    | 50 $\mu$ lにする |

ミニプレップDNAを、Marksら(1991)に記載されるライブラリーから、PCRのテンプレートのために調製した。クローンから生成されたPCRを細菌コロニーから接種することにより調製した。

PCR条件は、94 $^{\circ}$ Cで1分間、55 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで2分間を25サイクル、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間であった。

一次PCR産物を、そのより小さいサイズのためにMermaid精製(Bio101)を必要とするCDR3フラグメント以外はPromega Magic PCR Prep Systemを使用してゲル

精製した。

CDR1+2シャッフリング

単離されたクローン由来のVH CDR3-リンカー-VLフラグメントとのライブラリー-CDR1+2フラグメントのアセンブリ

|                                    |             |
|------------------------------------|-------------|
| 精製ライブラリーCDR1+2DNA                  | 20-50 ng    |
| 単離されたクローン由来の精製VHCDR3-リンカー-VLフラグメント | 20-50 ng    |
| 10 $\times$ PCR緩衝液                 | 5.0 $\mu$ l |
| 5mM各 dNTP                          | 2.5 $\mu$ l |
| Taqポリメラーゼ                          |             |

|                                     |               |
|-------------------------------------|---------------|
| (5U/ $\mu$ l)                       | 0.3 $\mu$ l   |
| 水                                   | 50 $\mu$ lにする |
| 一次PCRについてのPCR条件                     |               |
| <u>アセンブルされたCDR1+2シャッフルDNAの二次PCR</u> |               |
| アセンブリ産物                             | 1.0 $\mu$ l   |
| FDTSEQ1プライマー                        |               |
| (10pmoles/ $\mu$ l)                 | 2.5 $\mu$ l   |
| LMB3プライマー                           |               |
| (10pmoles/ $\mu$ l)                 | 2.5 $\mu$ l   |
| 10 $\times$ PCR                     |               |
| 反応緩衝液                               | 5.0 $\mu$ l   |
| 5mM各dNTP                            | 2.5 $\mu$ l   |
| Taqポリメラーゼ                           |               |
| (5U/ $\mu$ l)                       | 0.3 $\mu$ l   |
| 水                                   | 50 $\mu$ lにする |

## CDR3シャッフリング

単離されたクローン由来のCDR1+2フラグメントとのライブラリーCDR3フラグメントのアセンブリ

|                      |               |
|----------------------|---------------|
| 精製ライブラリーCDR3 DNA     | 20-50 ng      |
| 単離されたクローン由来の精製CDR1+2 | 20-50 ng      |
| 10 $\times$ PCR緩衝液   | 5.0 $\mu$ l   |
| 5mM各dNTP             | 2.5 $\mu$ l   |
| Taqポリメラーゼ            |               |
| (5U/ $\mu$ l)        | 0.3 $\mu$ l   |
| 水                    | 50 $\mu$ lにする |

単離されたクローン由来のアセンブルされたライブラリーCDR3-CD1+2シャッフルDNAの二次PCR

|         |             |
|---------|-------------|
| アセンブリ産物 | 1.0 $\mu$ l |
|---------|-------------|

## PCRHLINKプライマー

実施例11

「インプリンティング」によるヒト触媒性抗体の誘導

「インプリンティング」のプロセスは、所望の結合特徴を有する既存の抗体を使用して同様の特徴を有する新たな抗体を誘導する工程を包含する。このプロセスは、もとの抗体鎖またはその部分を相補的な部分のライブラリーと再度組合せることにより行われる。新たな抗体エレメントが見出されると（これはもとの抗体結合特徴を相補する）、これらをもとの抗体結合特徴を置換するライブラリーと再度組合せ、これらをもとの抗体結合部分を置換するライブラリーと再度組合せ、もとの抗体の結合を模倣する完全に新たな抗体を与える（PCT/GB/92/01755）。このアプローチは、既存のマウス触媒性抗体からヒト触媒性抗体を誘導するために使用され得る。

本実施例は「2段階の変換」を記載する。もちろん、これは複数回の工程にわたって、または単一の工程において行われ得る（もとの抗体の部分からなるハイブリッド分子が十分である場合）。

これは、例えば既存のマウス抗体と同様の結合活性を有するヒト抗体を誘導するために有用な方法である。

pCANTabベクター中の触媒性ファージ抗体クローン18および83（実施例5.2を参照のこと）を（pCANTABベクター中にクローン化された）、別々の重鎖および軽鎖のPCR増幅のためのテンプレートとして使用した。上記のように重鎖をLMB3およびPCRHLINKを用いて増幅し、そして軽鎖をLINKPCRLおよびFDTSEQ1を用いて増幅した。ヒト重鎖および軽鎖のライブラリーもまた同じプライマーを使用して、上記のMarksら、J.Mol.Biol. 222(1991): 581-597により記載されるヒトscFVライブラリーから調製したDNAを用いてPCRにより増幅した。

次いで、各クローン由来の個々のマウスの重鎖を、上記のようにPCR結合によりヒト軽鎖のライブラリーと再度組合せた。同様に、個々の軽鎖を同じ方法で、重鎖のライブラリーと再度組合せた。

得られた結合産物を、NotIとともに、ApaLI（マウス重鎖について）またはSfi

I (ヒト重鎖について) で消化し、適切な pCANTAB ベクターに連結し、そして E.co li TG1 細胞に形質転換した。全ての工程は上記のとおりであった。

それぞれの別々のライブラリーを有する TG1 細胞の個々の集団を、30℃で 2 ～ 3 時間増殖させ、そして 37℃で VCSM13 ヘルパーファージでの感染によりレスキューした。一晚の増殖後、ファージ粒子を採集し、そして濃縮した。各集団を数回 RT3-BSA に対してパンニングし、そして個々の結合クローンを ELISA により同定した。

結合クローンを選択し、そして各クローンのヒト鎖を前述のように PCR により増幅した。この鎖を、相補的な鎖のヒトライブラリーの PCR 産物と再度組合せた。PCR 結合、SfiI および NotI での消化、ライゲーション、形質転換、ファージレスキュー、パンニングおよびスクリーニングは前述のとおりであった。

この方法において、結合プロフィールはもとのマウスクローンにより方向づけられたが、完全にヒトであった RT3 バインダーの新たな集団が誘導された。上記の実施例は、別々の鎖のシャッフリングによるインプリンティングを包含するが、単一回または複数回における鎖の部分のシャッフリングに等しく適用し得る (上記のように)。ライブラリー物質は、Marks ら、J.Mol.Biol. 222 (1991) : 581-597 ライブラリーに由来したが、ヒト血液、脾臓などの PCR 産物に等しく由来し得、あるいは、部分的にまたは全体的に合成 DNA に由来し得る。

上記の実施例は、単一のレプリコンにおける単鎖 Fv 内の鎖のシャッフリングを包含する。同様の結果が、ファージにおいて提示された非結合 VH/VL または VH-CH G/VL-CL フラグメントを使用することにより達成され得る (McCafferty ら、W092/01047)。これらはまた同じレプリコンにおいてであり得、または異なるレプリコンにおいてであり得る。例えば、もとのマウス抗体の重鎖は、pUC19 または他のプラスミドに、細菌のペリプラズムにおいて可溶性 VH または VH-CH1 フラグメントとして発現させることを可能にする適切なプロモーター、シグナルペプチドおよび停止コドン (1 つまたは複数) とインフレームにクローン化され得る (Better ら、1989; Skerra ら、1989)。次いで、このプラスミドを有する細胞の増殖培養物を、例えば、ヒト軽鎖 (VL または VL-CL のいずれか、適切なように) のライ

ブラリーに由来するヘルパーファージで感染させ、fd-CAT1またはfd-DOG1中で遺伝子IIIとの融合体としてクローン化し得る(McCaffertyら、上述、1991)。これは、マウスクローン由来の重鎖パートナーを有する、遺伝子IIIに融合された

個々のヒト軽鎖を発現するファージの集団を生じさせる。マウス鎖の結合活性を相補するこれらのヒト鎖は、パンニング(McCaffertyら、上述、1991)により濃縮され、そしてこの鎖をコードする遺伝子がファージ粒子中に存在する。

この方法に由来する軽鎖は、もとのマウス鎖について行われたように、ペリプラズムにおける単鎖の可溶性発現のためにベクターに再クローン化され得る。前述のように、これらの個々のヒト軽鎖を発現する細胞の増殖培養物を、例えば、ヒト重鎖のライブラリーに由来するヘルパーファージで感染させ、fd-CAT1またはfd-DOG1中で遺伝子IIIとの融合体としてクローン化し得る(McCaffertyら、上述、1991)。前述のように、抗原に対してパンニングして適切な結合活性を有するクローンを濃縮する。この結果、もとのマウスクローンの結合を反映する一対のヒトクローンを生じる。

同様のプロセスを、初めにヒト重鎖、次いで軽鎖とシャッフリングすることにより行い得る。あるいは、重鎖および軽鎖の1回の別々のシャッフリングに由来する濃縮された集団またはクローンを、SCFv(1つまたは複数)または別々の鎖のいずれかについて上記したと同じ方法で互いに再度組合せ得る。

【 図 1 】

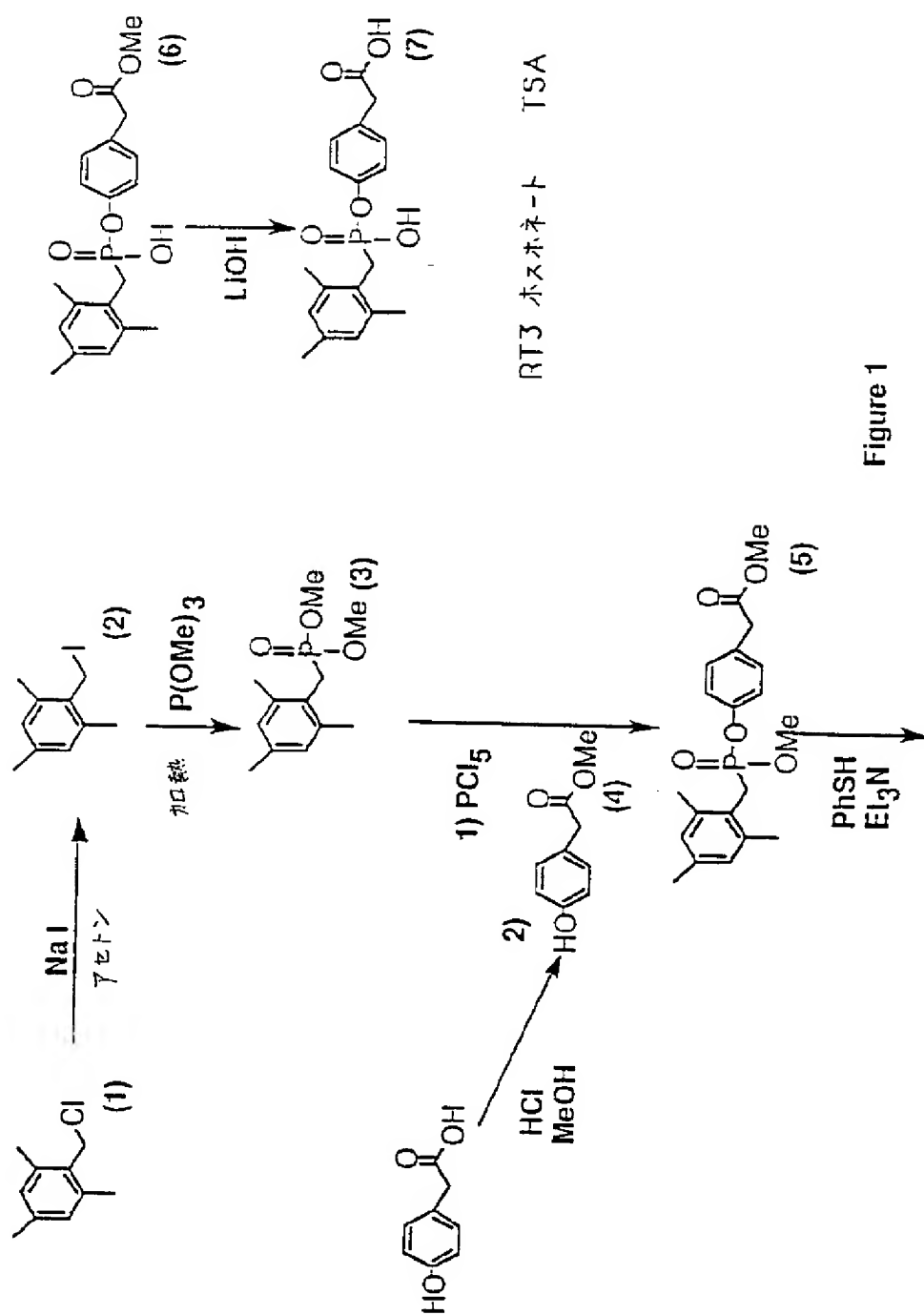


Figure 1

【 図 2 】

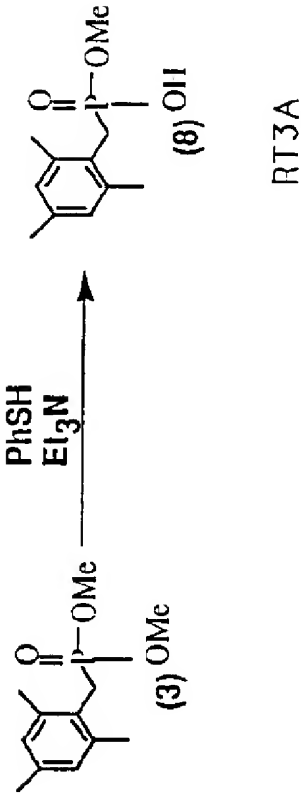
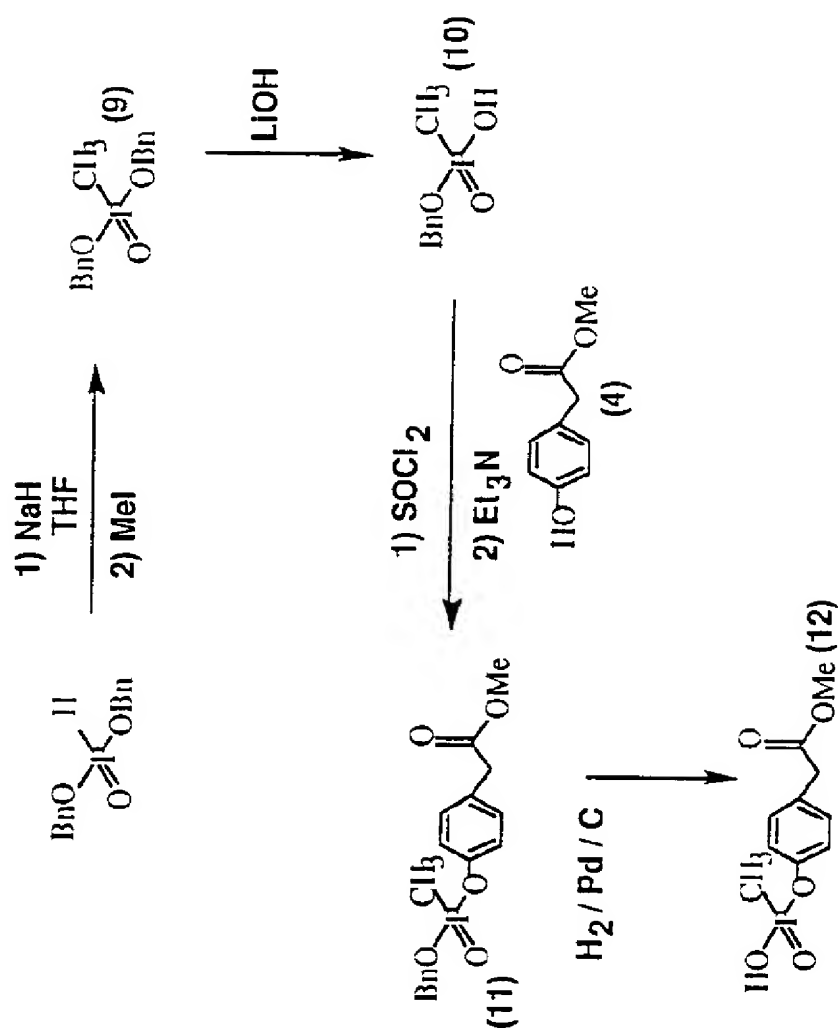


Figure 2

【 图 3 】



RT3B

Figure 3



【 图 4 】

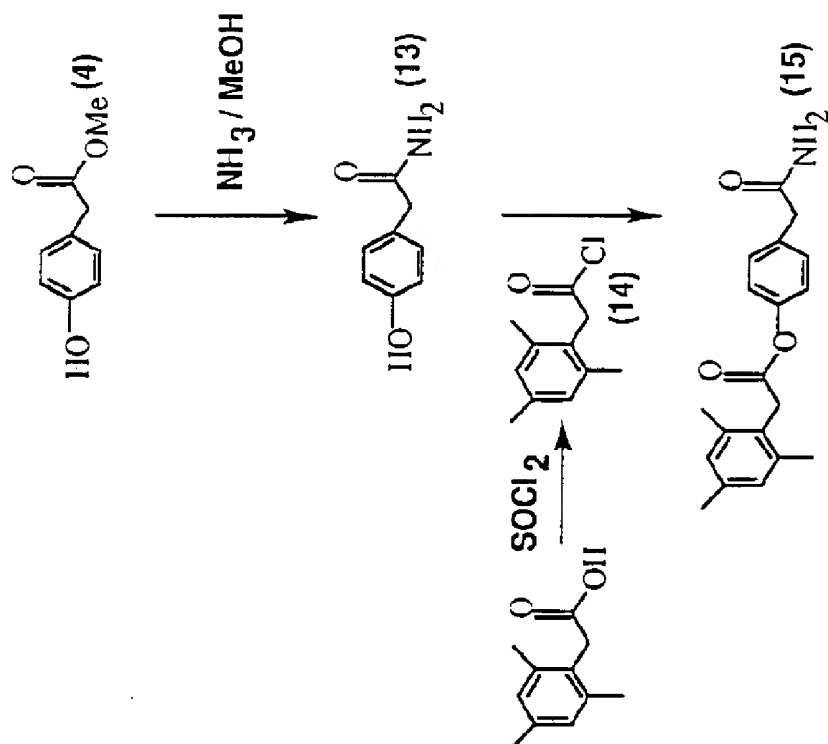


Figure 4



I, N G A A アシハ  
aat ggg gcc gca タグ-遺子33

【図6】

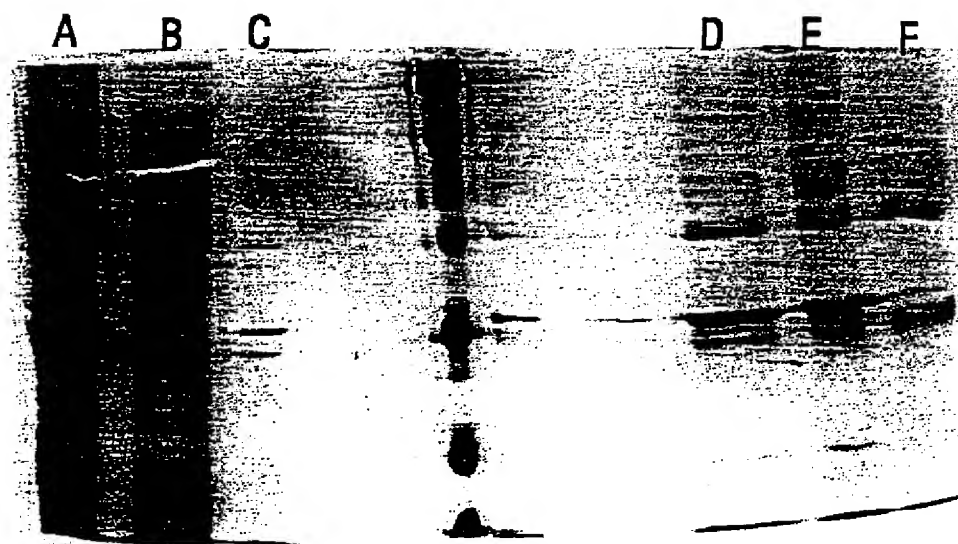


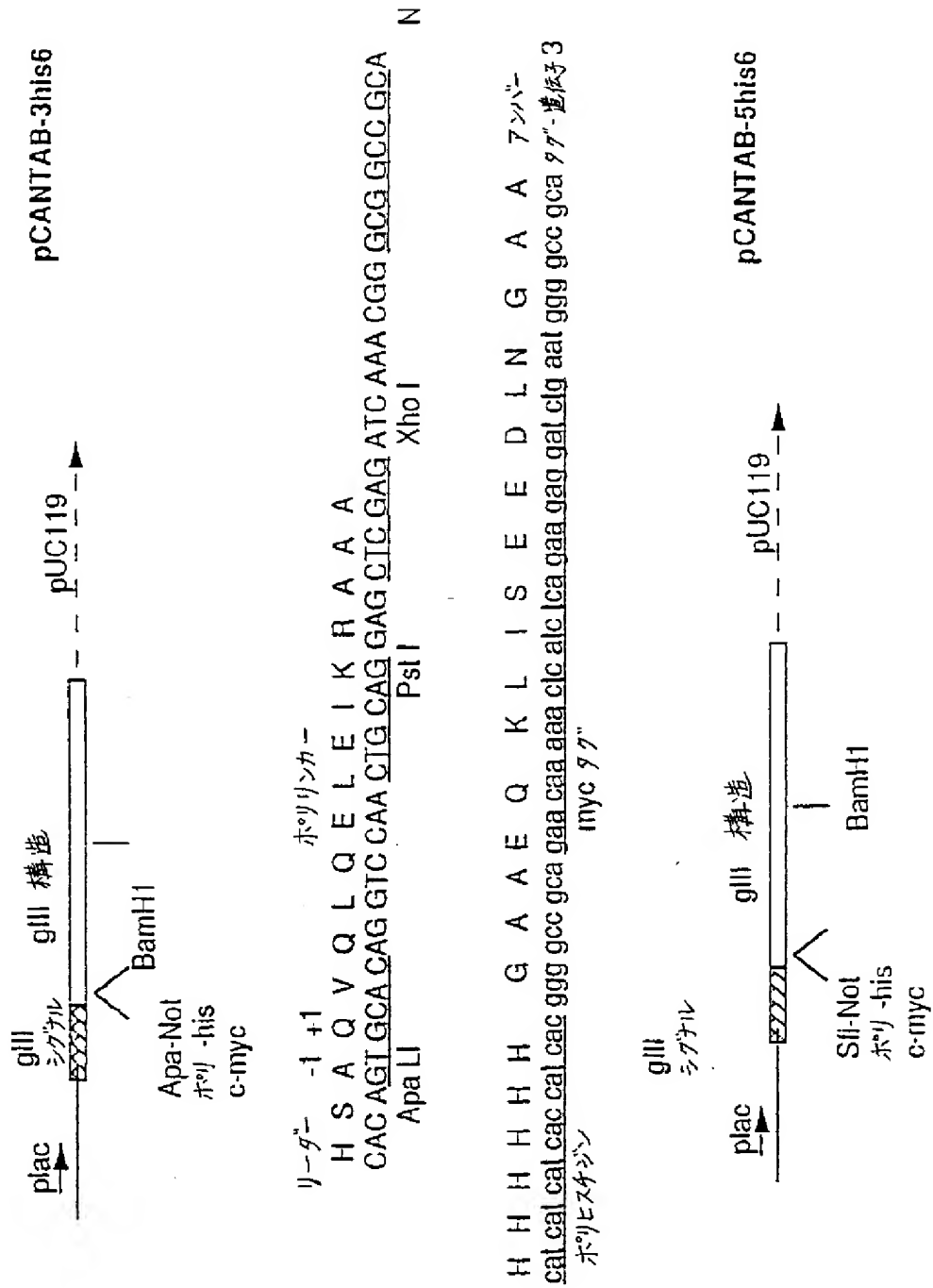
Figure 6

gIII/pelB リーダー  
V K K L L F A I P L V V P F Y A A Q P A  
GTG AAA AAA TTA TTC GCA ATT CCT TTAGTT GTT CCT TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC

SfiI NcoI PstI XhoI NotI

H H H H H G A A E Q K L I S E E D L N G A A アンバー  
cal cal cal cac cac gcc gca gaa caa aaa ctc alc tca gaa gag gal clg aat ggg gcc gca タグ・コード3  
ホリヒス4ジン myc タグ

Figure 7



-1 ポリリンカー-

M A I Q V Q L Q E L E I K R A A A  
ATGGCC CAG GTC CAA CIGCAG GAG CTC GAG ATC AAA CGG GCG GCC GCA

【 図 8 】

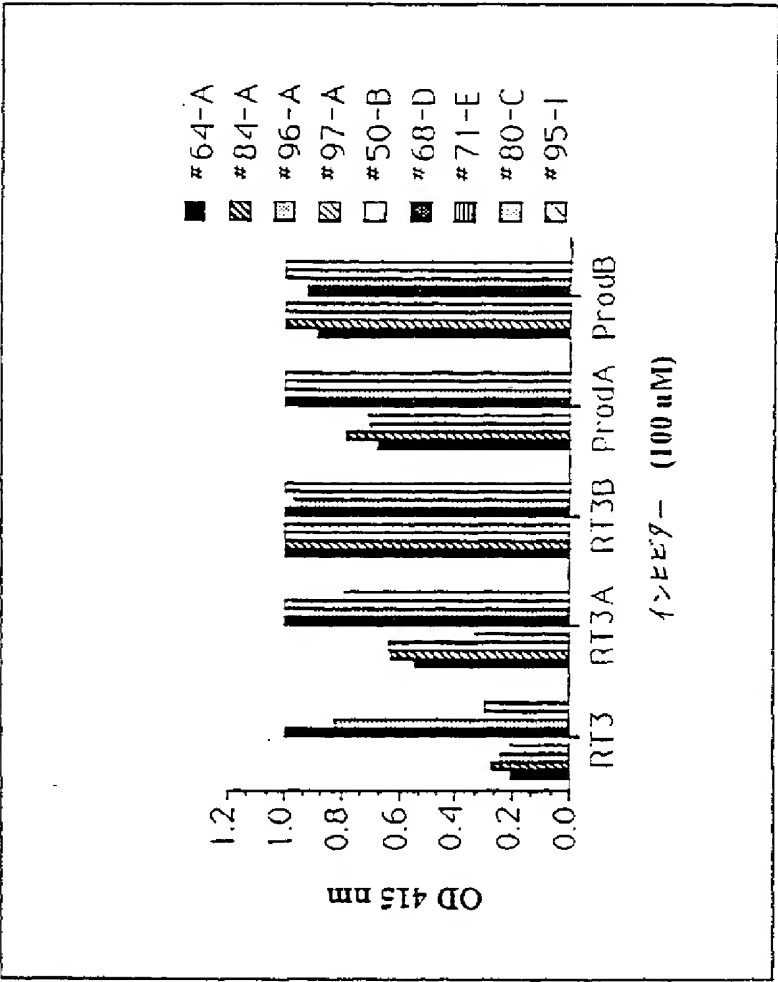


Figure 8

| YKBACK          | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
|-----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| PCR / 〃 〃 〃 / A |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| MIKEONX         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| PCR / 〃 〃 〃 / A |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 1               | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 2               | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 3               | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 4               | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 5               | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 6               | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 7               | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 8               | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 9               | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 10              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 11              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 12              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 13              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 14              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 15              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 16              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 17              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 18              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 19              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 20              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 21              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 22              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 23              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 24              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 25              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 26              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 27              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 28              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 29              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 30              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 31              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 32              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 33              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 34              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 35              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 36              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 37              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 38              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 39              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 40              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 41              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 42              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 43              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 44              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 45              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 46              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 47              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 48              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 49              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 50              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 51              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 52              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 53              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 54              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 55              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 56              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 57              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 58              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 59              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 60              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 61              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 62              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 63              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 64              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 65              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 66              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 67              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 68              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 69              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 70              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 71              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 72              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 73              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 74              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 75              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 76              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 77              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 78              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 79              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 80              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 81              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 82              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 83              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 84              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 85              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 86              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 87              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 88              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 89              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 90              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 91              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 92              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 93              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 94              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 95              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 96              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 97              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 98              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 99              | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |
| 100             | S  | S  | L  | S  | A  | S  | L  | G  | C  |



【 図 9 】

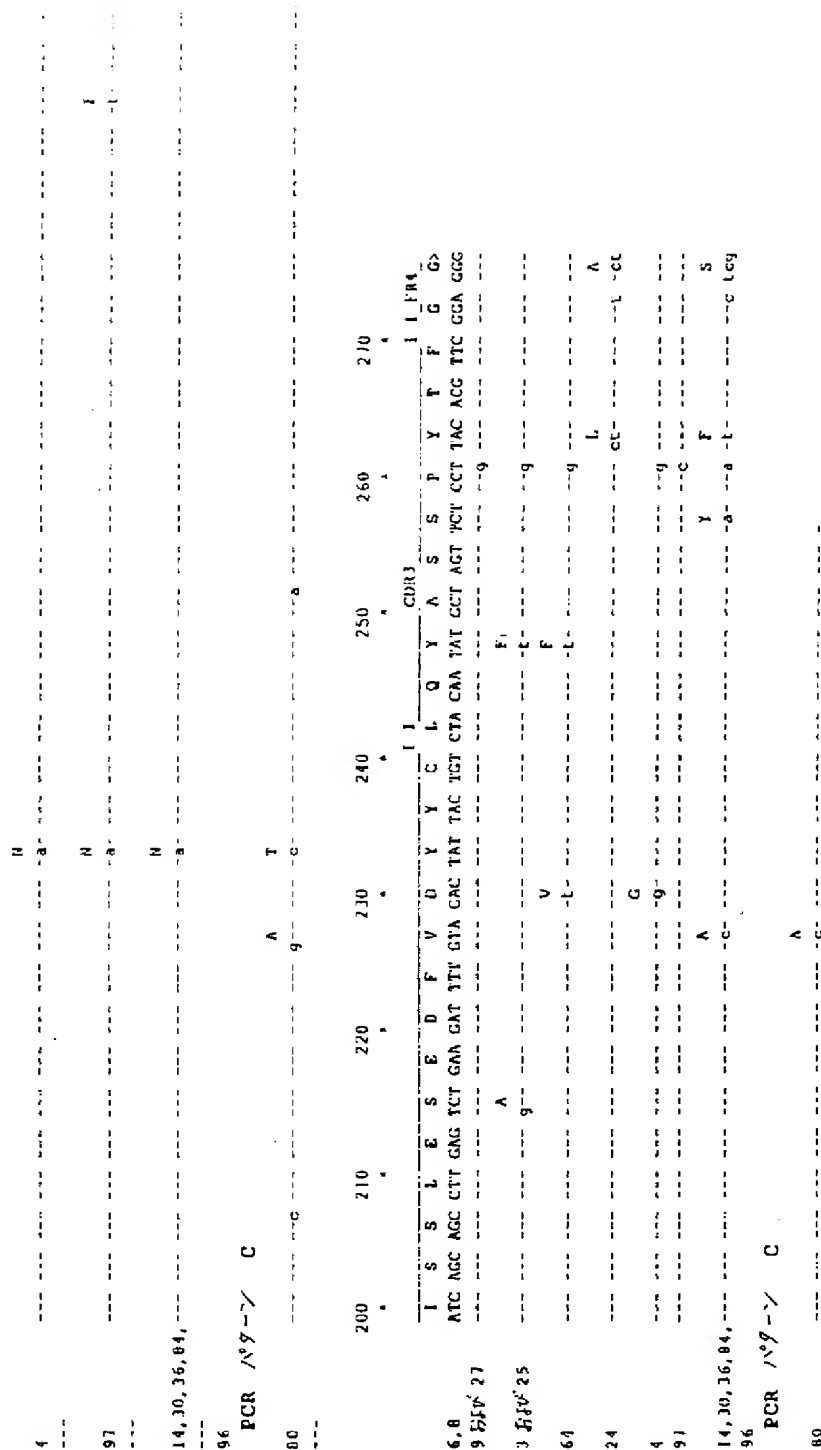


Figure 9



```

MUS1GKVH2
---
a-g
100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
. . . . .
生殖系列
Q K S G Q P P K L L I Y L A S N L Q S G V P A H F S G S G S R T
II CDR2 I I CDR3 FR3
10,43,68,83 CAG AAA TCA GGA CAG CCA CCC AAA CAG CTC ATC TAT CTT CGA TCC AAC CTA CAA TCT CCG GTC CCT GCC AGC TTC ACT GGC ACC GCG TCT AGC
ACA GAC
P
MUS1GKVH2
---
g-e
200 210 220 230 240 250 260 270
. . . . .
生殖系列
F T L T I D P V E A D D A A T Y Y C L Q N T E D P>
TTC ACC CTC ACC ATT GAT CCT GTG CAG GGT GAT GAT CCA ACC TAT TAC TCT CTC CAA AAT ACT CAG GAT CCG
Q N
MUS1GKVH2
---
a-t
PCR 109- I
MUSKONX
10 20 30 40 50 60 70 80 90
. . . . .
I S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S P G H T Y L H
FR1 I I CDR1 I I FR2
CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT CGA GAT CAA GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AAT CAG ACC CTT GTA CAC AGT CCG GUA AAC ACC TAT TTA CAT T
Y>
95
TAC
MUS1GKVH2
---
N
200 210 220 230 240 250 260 270
. . . . .
100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
. . . . .
I Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G
II CDR2 I I FR3
CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGS GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GAG
ACA
MUS1GKVH2
---
200 210 220 230 240 250 260 270
. . . . .

```

【 1 0 】

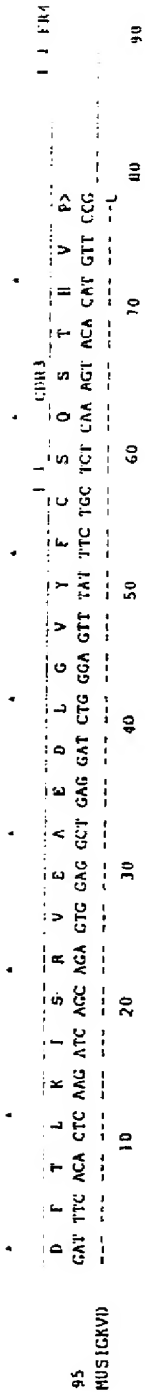


Figure 10

12

【 1 1 1 】

|                 |                                                                                                         |         |     |     |     |     |     |     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 200                                                                                                     | 210     | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 |
|                 | •                                                                                                       | •       | •   | •   | •   | •   | •   | •   |
|                 | I S S L E S E D F V D Y Y C L Q Y A S S P Y T F G                                                       | I I FR4 |     |     |     |     |     |     |
| 6,0 (A)         | ATC AGC AGC CTT GAG TCT GAA GAT TTT GTA GAC TAT TAC TGT CTA CAA TAT GCT AGT TCT CCT TAC ACG TTC GGA GGG |         |     |     |     |     |     |     |
|                 |                                                                                                         |         |     |     |     |     |     |     |
| 80 (C)          |                                                                                                         |         |     |     |     |     |     |     |
|                 |                                                                                                         |         |     |     |     |     |     |     |
| 50.69 (B)       |                                                                                                         |         |     |     |     |     |     |     |
|                 |                                                                                                         |         |     |     |     |     |     |     |
|                 |                                                                                                         |         |     |     |     |     |     |     |
| 95(1)           |                                                                                                         |         |     |     |     |     |     |     |
| 10,43,68,83 (D) |                                                                                                         |         |     |     |     |     |     |     |

Figure 11

VIII BACK CAG GTC AAG CTG CAG CAG TCA GG

生殖系列

[illegible]











[illegible]

【 14 】

```

200      210      220      230      240      250      260      270      280      290
1  -----FRJ-----
      K  A  T  L  T  S  D  K  S  S  N  T  A  Y  H  E  L  S  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A  G
49,50,69,90  AAG GCC ACA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCG GCG
TTT
      (D)  S
80 (C)  -----
95 (I)  -----
      T  L  Y  Y  Y  A  H  A  S  Q
10,26,41,68,83  -----
a-a acg tta tat tag tat gct atg
      (D)  V  S  N
14 (N)  -----
gac aat ccc cgt ttt
      A
      COR3 1  L  -----FRJ-----
      A  H  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
49,50,69,90  GGT CAG TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
      Y
80 (C)  -----
95 (I)  -----
      D  Y
10,26,41,68,83  gac t-----
      (D)  A  F
14 (N)  gct ttc -----C CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
      VIKOR-2 (REV)  GG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Figure 14

【図15】

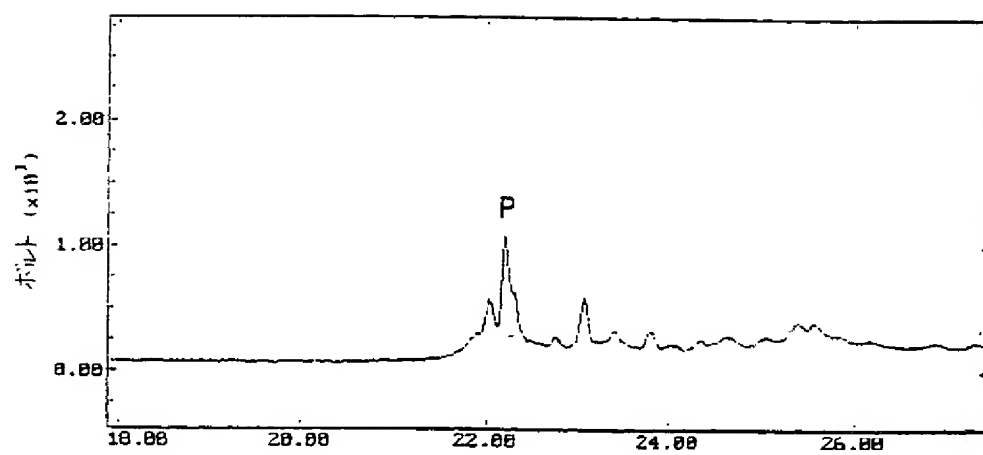


Figure 15A

【図15】

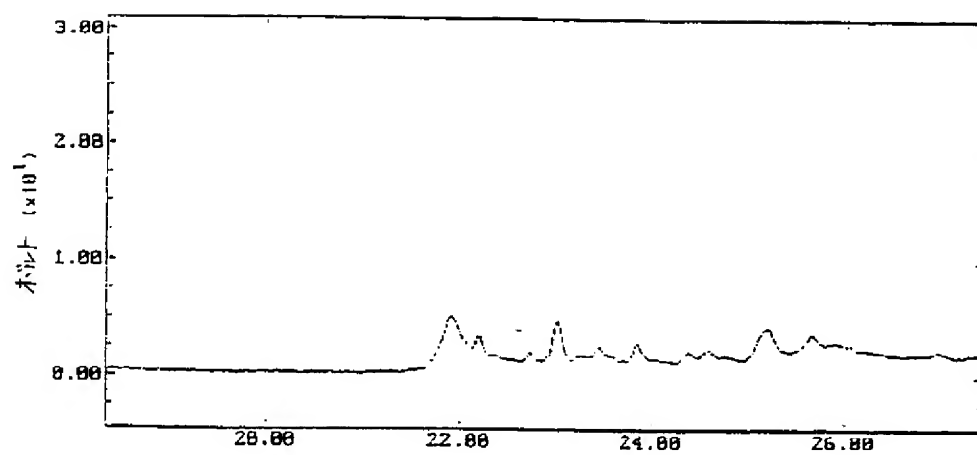


Figure 15B



【図15】

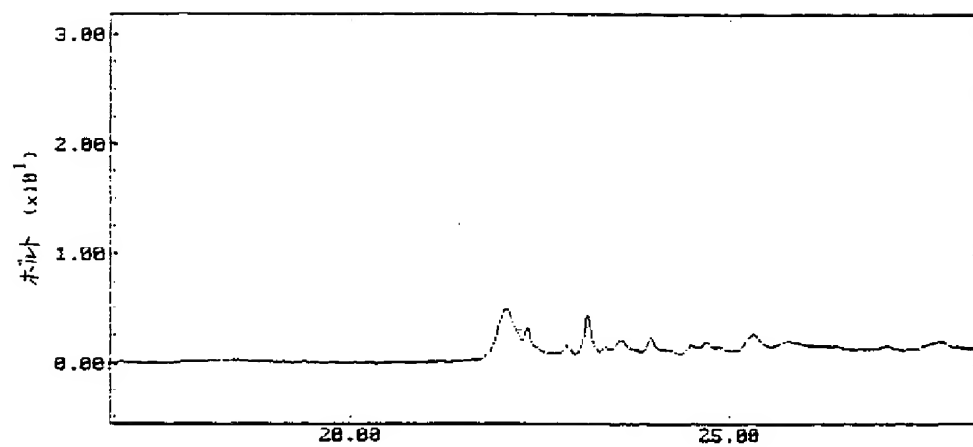


Figure 15C

【図16】

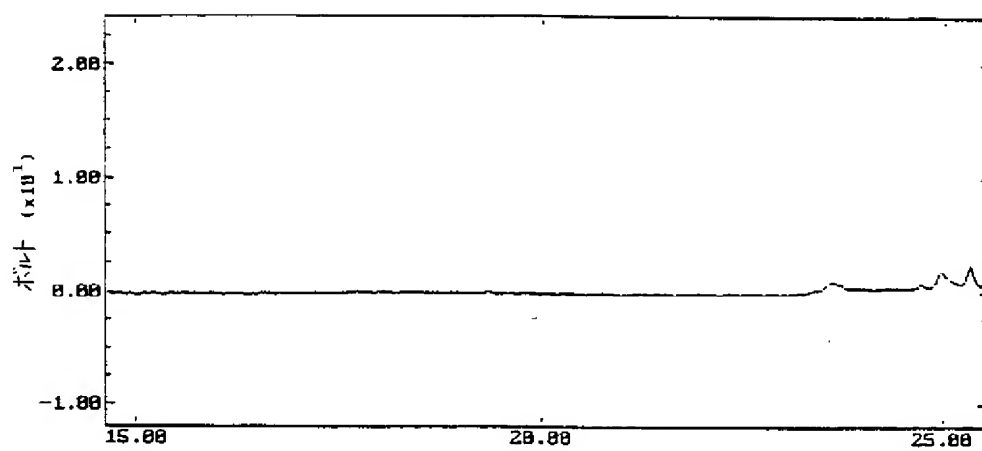


Figure 16

(110)

特表平10-507341

【☒ 17】

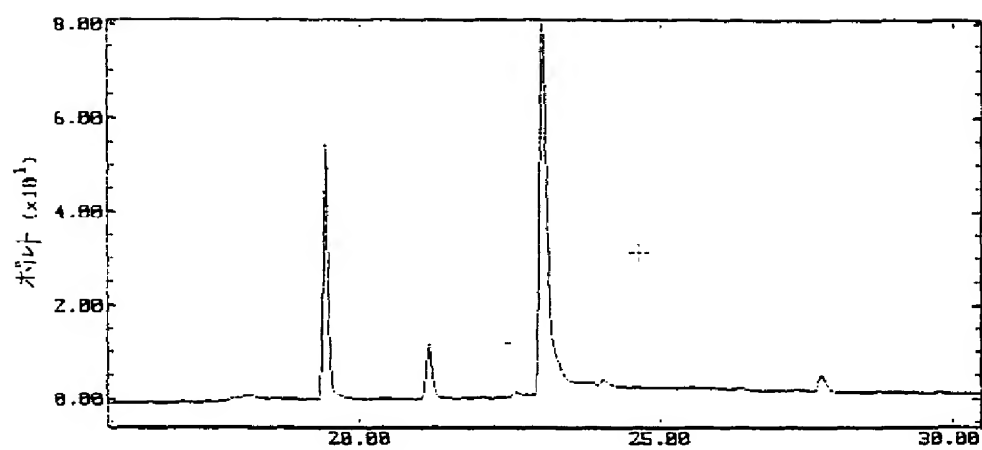


Figure 17A

【 図 1 7 】

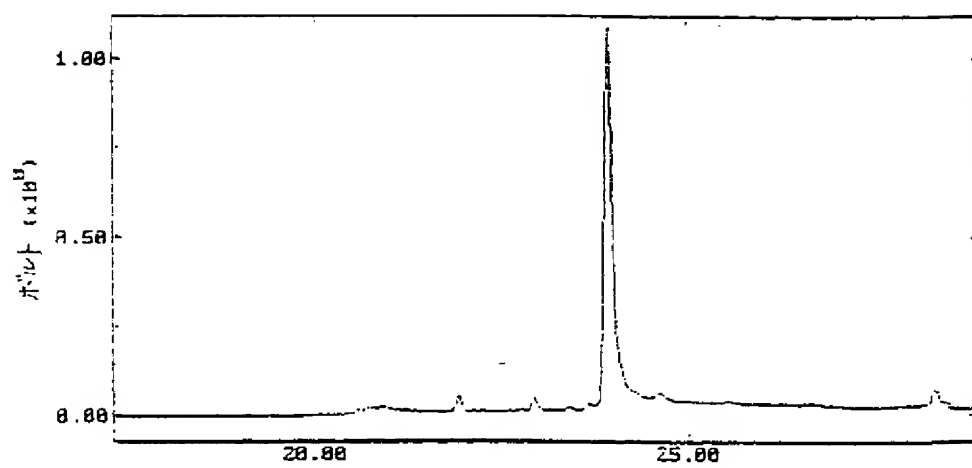


Figure 17B

【图18】

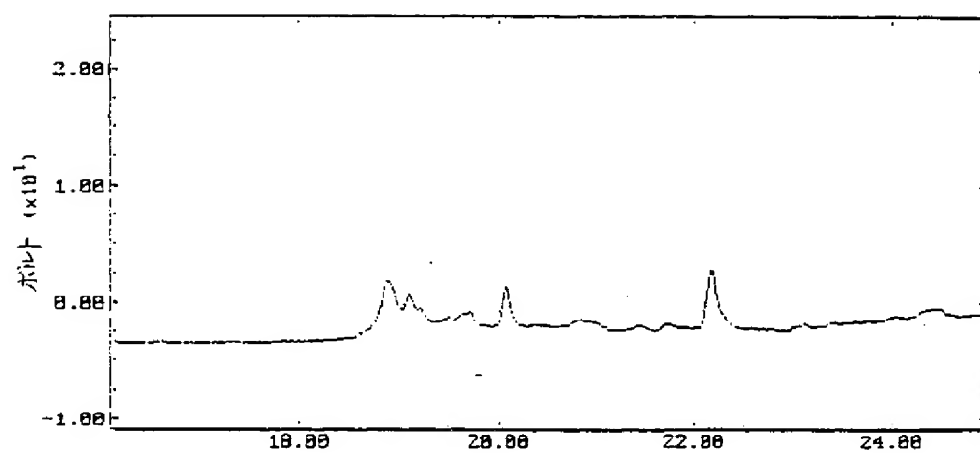


Figure 18

【 図 1 9 】

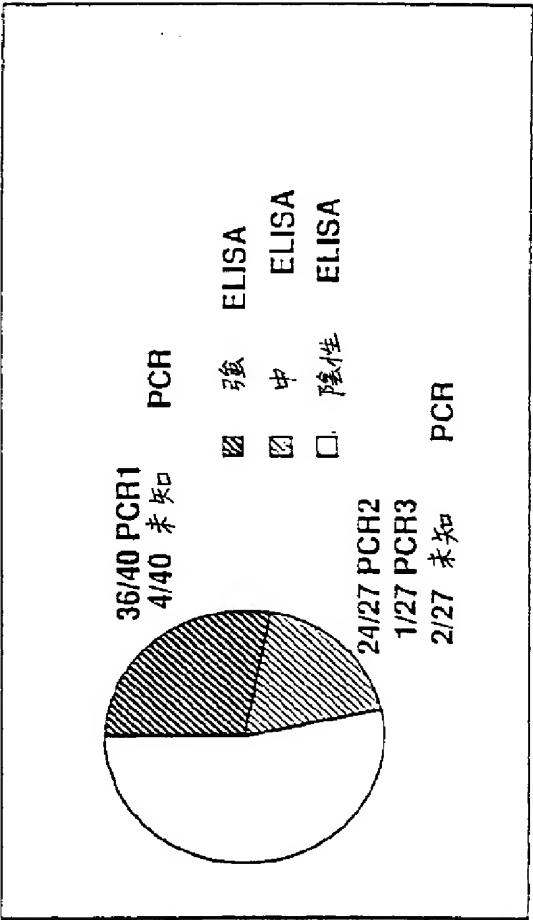


Figure 19A

【 図 1 9 】

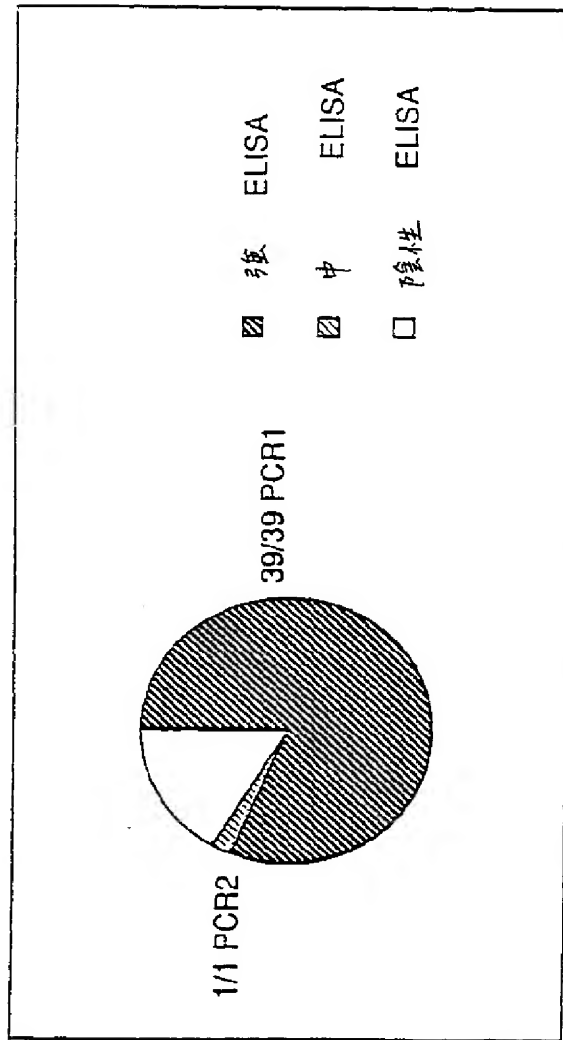


Figure 19B

鎖  
鑰

[illegible]



轻链

..... FR 1 CDR 1  
 CAC CCT CAG CGT CTG GAC CCC GGG CAG AGG GTC ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC  
 GTG GGA GTC GCA GAC CTG GGG CCC GTC TCC CAG TGG TAG AGA ACA AGA CCT TCG  
 His Pro Gln Arg Leu Asp Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser

FR 2  
 AGC TCC AAC ATC GGA AGA AGT ACT GTA AGC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGC ACG  
 TCG AGG TTG TAG CCT TCT TCA TGA CAT TCG ACC ATG GTC GTC GAG GGT CCG TGC  
 Ser Ser Asn Ile Gly Arg Ser Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr

CDR 2 FR 3  
 GCC CCC AAA CTC GTC ATG TAT AGT CAC AAT CAG CGG TCC TCA GGG GTC CCT GAC  
 CGG GGG TTT GAG CAG TAC ATA TCA GTG TTA GTC GCC AGG AGT CCC CAG GGA CTG  
 Ala Pro Lys Leu Val Met Tyr Ser His Asn Gln Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp

CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC TCA GCC TCC CTG GAC ATC AGT GGG CTC  
 GCT AAG AGA CCG AGG TTC AGA CCG TTG AGT CGG AGG GAC CTG TAG TCA CCC GAG  
 Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Asp Ile Ser Gly Leu

CDR 3  
 CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA GCA TGG GAT GAC AGC CTG AGT  
 CTC AGA CTC CTA CTC CGA CTA ATA ATG ACA CGT CGT ACC CTA CTG TCG GAC TCA  
 Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser

FR 4  
 GAA TTT CTC TTC GGA ACT GGG ACC AAG GTC ACC GTC CTA GGT  
 CTT AAA GAG AAG CCT TGA CCC TGG TTC CAG TGG CAG GAT CCA  
 Gln Phe Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

[illegible][illegible]

| FR 3 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AGT  | AGT | AGT | GGT | GAC | ACA | TAC | TAC | GCA | GAC | TCA | GTG | AAG | GGC | CGA | TTC | ACC | ATC |
| Ser  | Ser | Ser | Gly | Asp | Thr | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile |
| AGT  | TCA | TCA | CCA | CTG | TGT | ATG | ATG | CGT | CTG | AGT | CAC | TTC | CCG | GCT | AAG | TGG | TAG |

TTCC AGA GAC AAC GCC CAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GTC  
 TGG TCG TCT CTG TTG CGG GTC TTG AGT GAC ATA GAC GTT TAC TTG TCG GAC TCT CAG  
 Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Ser Leu Tyr Leu Met Asn Ser Leu Arg Val

CDR 3

FR 4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GAC | TAC | TGG | GGC | CAG | GGG | ACC | CTG | GTC | ACC | GTC | TCC |
| CTG | ATG | ACC | CCG | GTC | CCT | TGG | GAC | CAG | TGG | CAG | AGG |
| Asp | Tyr | Tyr | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser |

輕鎖

| ...FR 2 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | CDR 2 |     |     |     |     |     |     |     |     |      | FR 3 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GTA     | CTT | GTC | ATC | TAT | TAT | GGT | AAA | AAC | AAC | CGG   | CCC | TCA | GGG | ATC | CCA | GAC | CGA | TTC | GTA  | CTT  | GTC | ATC | TAT | TAT | GGT | AAA | AAC | AAC | CGG | CCC | TCA | GGG | ATC | CCA | GAC | CGA | TTC |
| CCAT    | GAA | CAG | TAG | ATA | CCA | TTT | TTG | TTC | GCC | GGG   | AGT | CCC | TAG | GGT | CTG | GCT | AAG |     | CCAT | GAA  | CAG | TAG | ATA | CCA | TTT | TTG | TTC | GCC | GGG | AGT | CCC | TAG | GGT | CTG | GCT | AAG |     |
| Val     | Leu | Val | Ile | Tyr | Gly | Lys | Asn | Asn | Arg | Pro   | Ser | Gly | Ile | Pro | Asp | Arg | Phe |     | Val  | Leu  | Val | Ile | Tyr | Gly | Lys | Asn | Asn | Arg | Pro | Ser | Gly | Ile | Pro | Asp | Arg | Phe |     |

TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG  
AGA CCG AGG TCG AGT CCT TTG TGT CGA AGG AAC TGG TAG TGA CCC CGA GTC CGC  
Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala

**CDR 3**

GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC AGC AGT GGT AAC CAT AGA  
CTT CTA CTC CGA CTG ATA ATG ACA TTG AGG GCC CTG TCG TCA CCA TTG GTA TCT  
Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Gly Asn His Arg

**FR 4**

GTT GTT ACG GCC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT  
CAA CAA TGC CGG CCT CCC TGG TTC GAC TGG CAG GAT CCA  
Val Val Thr Ala Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

鎖匙

[illegible]

FR 2  
CTG GCC TGG GTC CGG CAC CTC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATA  
CDR 2

GAC CGG ACC CAG GCC GTG GAG GGT CCC TTC CCC GAC CTC ACC TAA CCC TCA TAT  
 Leu Ala Trp Val Arg His leu Pro Gly lys Gly Leu Gln Trp Ile Gly Ser Ile

**FR 3**

CAT CAT AGT GGG CCC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATG  
 GTA GTA TCA CCC GGG TGG ATG ATG TTG GGC AGG GAG TTC TCA GCT CAG TGG TAC  
 His His Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met

TCA CCT GAC ACC TCC AGG AAC CAG TTT TCC CTG AAG ATG ACC TCT GTG ACC GCC  
 AGT GGA CTG TGC AGG TCC TTG GTC AAG AGG GAC TTC TAC TGG AGA CAC TGG CGG  
 Ser Pro Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe Ser Leu Lys Met Thr Ser Val Thr Ala

**CDR 3**

GCG GAC ACC GCG ATG TAT TAC TGT GCG AGG GAC CGA TAT GGT TAC TTT GAC TCC  
 CGC CTG TGC CGG TAC ATA ATG ACA CGC TCC CTG GCT ATA CCA ATG AAA CTG AGG  
 Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Gly Tyr Phe Asp Ser

**FR 4**

TGG GGC CAG GGA ACC CTG GCC ACC GTC TC  
 ACC CCG GTC CCT TGG GAC CCG TGG CAG AG  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ala Thr Val Ser

轻链**FR 1**

\*

CCT GCT TGG TTG CTT GTG GCC TTG GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA  
 GGA CGA ACC AAC GAA CAC CCG AAC CCT GTC TGT CAG TCC TAG TGT ACG GTT CCT  
 Pro Ala Trp leu leu Val Ala leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly

**CDR 1****FR 2**

GAC AGC CTC AGA AGT TAT TAT GCA AGT TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC  
 CTG TCG GAG TCT TCA ATA ATA CGT TCA ACC ATA GTC GTC TTC GGT CCT GTC CGG  
 Asp Ser leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

【 20 】

|             |              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|-------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
|             | <u>CDR 2</u> |     |     |     |     |     |     |     |     |     | <u>FR 3</u> |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| CCT         | GTA          | CTT | GTC | ATC | TCT | GGT | AAA | AAC | AAC | CGG | CCC         | TCA | GGG | ATC | CCA | GAC | CGA |  |  |  |
| GGA         | CAT          | GAA | CAG | TAG | AGA | CCA | TTT | TTG | TTG | GCC | GGG         | AGT | CCC | TAG | GGT | CTG | GCT |  |  |  |
| Pro         | Val          | Leu | Val | Ile | Ser | Gly | Lys | Asn | Asn | Arg | Pro         | Ser | Gly | Ile | Pro | Asp | Arg |  |  |  |
|             |              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| TTT         | TCT          | GCC | TCC | AGC | TCA | GGA | AAC | ACA | GCT | TCC | TTG         | ACC | ATC | ACT | GGG | GCT | CAG |  |  |  |
| AAG         | AGA          | CGG | AGG | TCG | AGT | CCT | TTG | TGT | CGA | AGG | AAC         | TGG | TAG | TGA | CCC | CGA | GTC |  |  |  |
| Phe         | Ser          | Ala | Ser | Ser | Ser | Gly | Asn | Thr | Ala | Ser | Leu         | Thr | Ile | Thr | Gly | Ala | Gln |  |  |  |
|             |              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|             | <u>CDR 3</u> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| GCG         | GAA          | GAT | GAG | GCT | GAC | TAT | TAC | TGT | CTC | TCT | CGG         | GAC | AGC | GGA | AGT | AAC | CAA |  |  |  |
| CGC         | CTT          | CTA | CTC | CGA | CTG | ATA | ATG | ACA | GAG | AGA | GCC         | CTG | TCG | CCT | TCA | TTG | GTT |  |  |  |
| Ala         | Glu          | Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Leu | Ser | Arg         | Asp | Ser | Gly | Ser | Asn | Gln |  |  |  |
|             |              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| <u>FR 4</u> |              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| CTG         | GTA          | TTC | GGC | GGA | GGG | ACC | AAG | CTG | ACC | GTC | CTA         | GGT |     |     |     |     |     |  |  |  |
| GAC         | CAT          | AAG | CCG | CCT | CCC | TGG | TTC | GAC | TGG | CAG | GAT         | CCA |     |     |     |     |     |  |  |  |
| Leu         | Val          | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Thr | Val | Leu         | Gly |     |     |     |     |     |  |  |  |

Figure 20

【 図 2 1 】

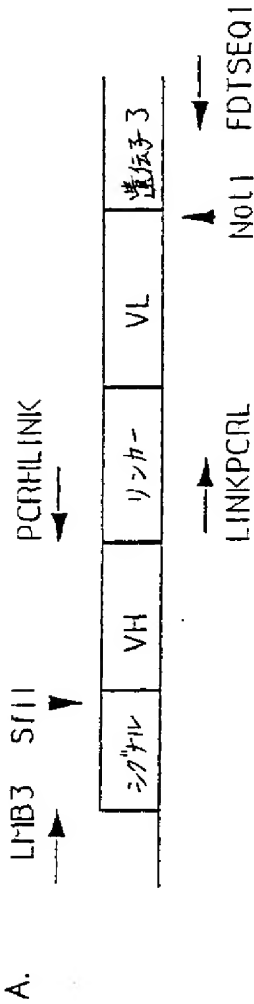


Figure 21

【 図 2 2 】

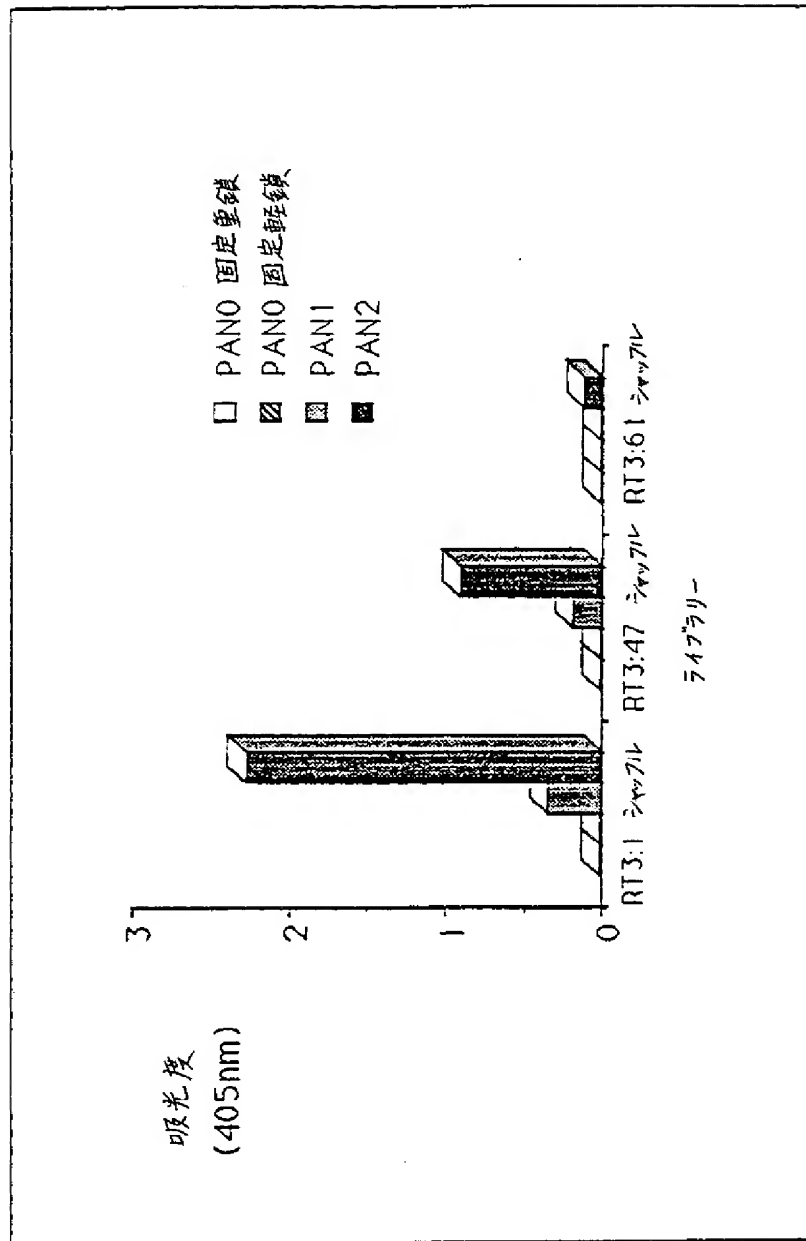


Figure 22

【 図 2 3 】

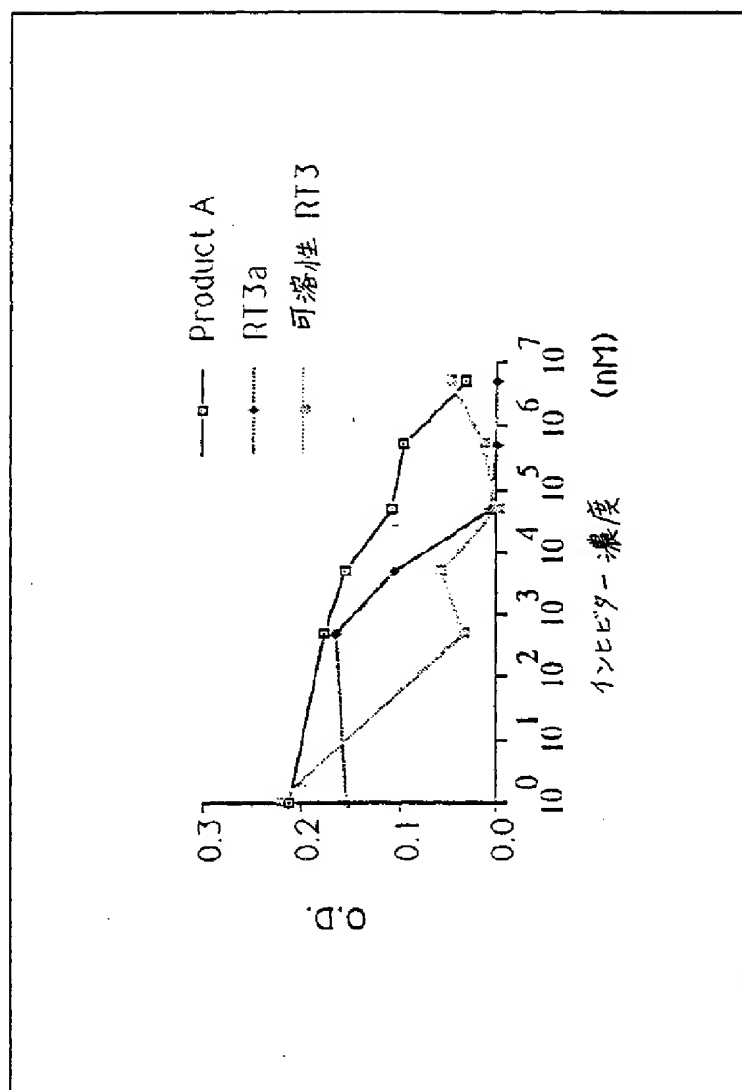


Figure 23A



【 図 2 3 】

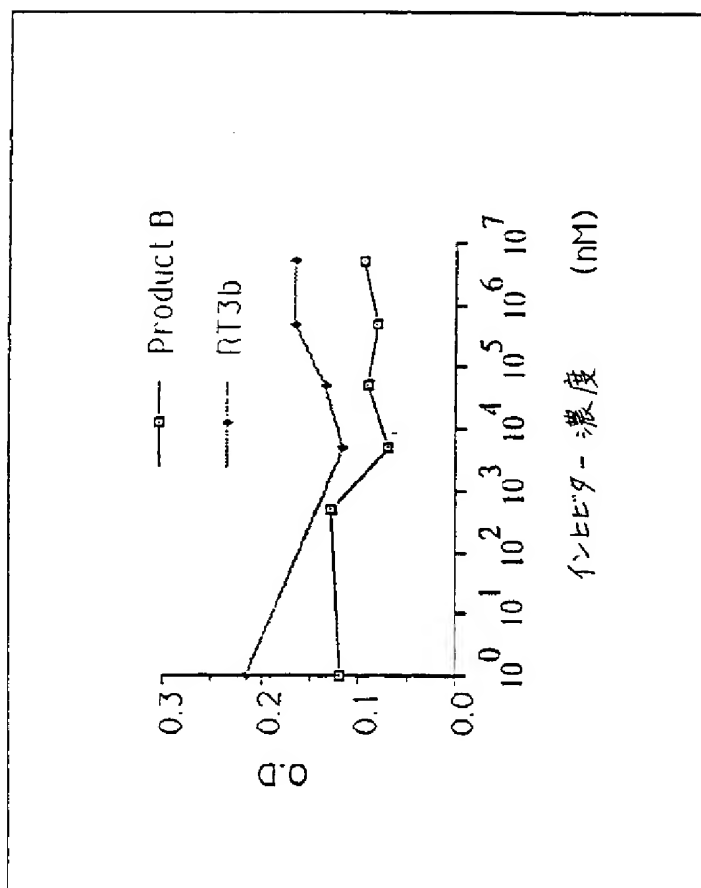


Figure 23B

【図24】

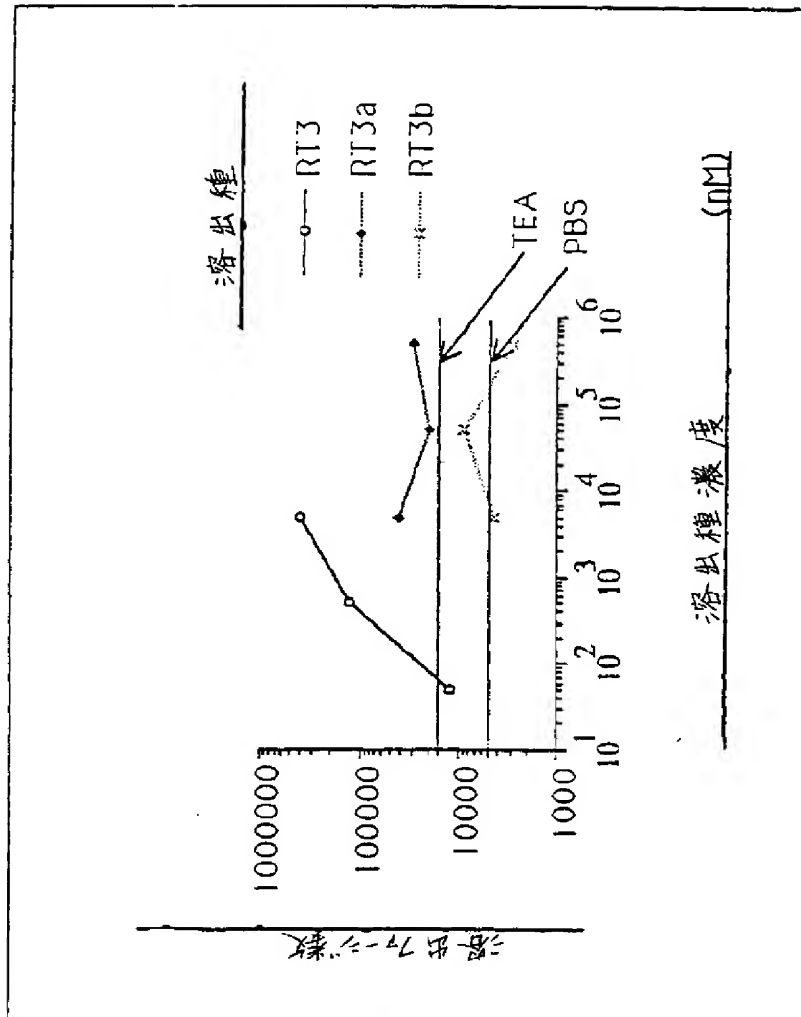


Figure 24A

【図24】

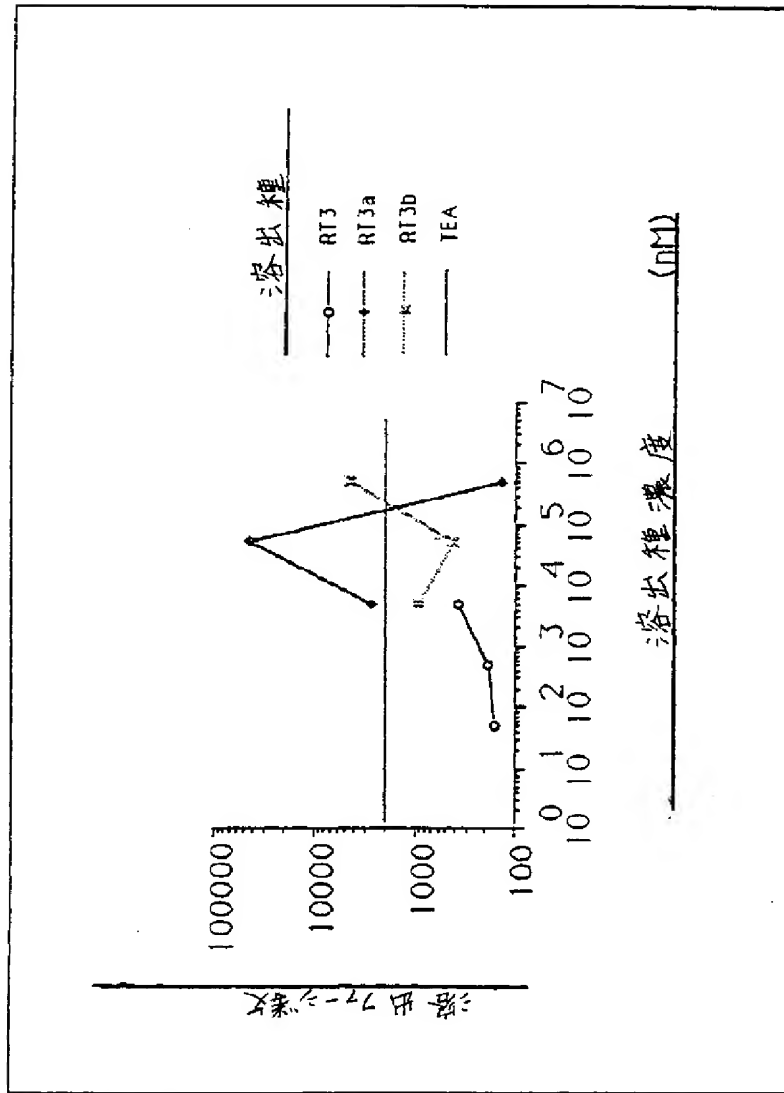


Figure 24B